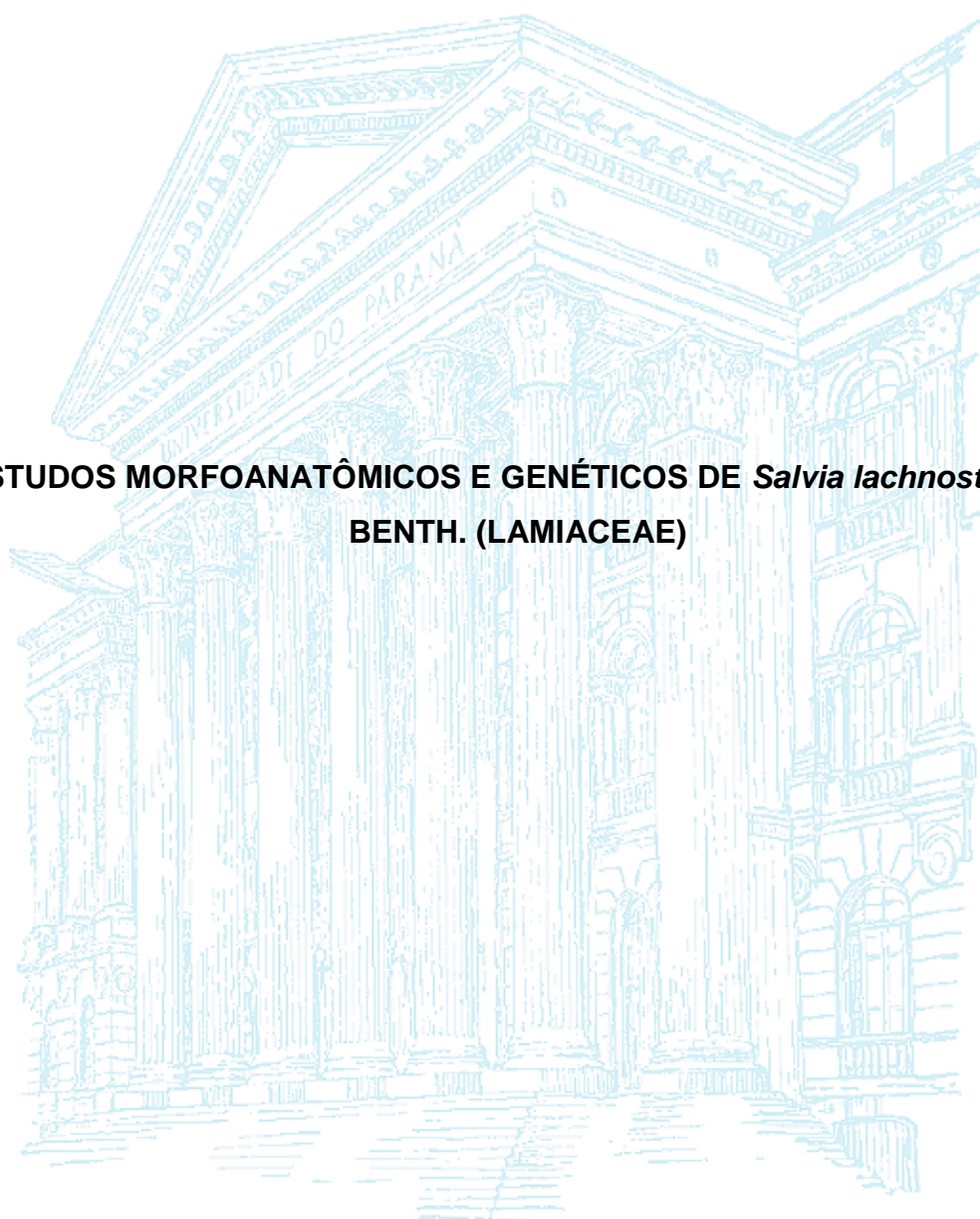


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANNA ERBANO

**ESTUDOS MORFOANATÔMICOS E GENÉTICOS DE *Salvia lachnostachys*
BENTH. (LAMIACEAE)**



CURITIBA

2014

MARIANNA ERBANO

**ESTUDOS MORFOANATÔMICOS E GENÉTICOS DE *Salvia lachnostachys*
BENTH. (LAMIACEAE)**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos,
Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor
em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientadora: Prof^a. Dra. Élide Pereira dos Santos
Coorientador: Dr. Guilherme Schnell e Schühli**

CURITIBA

2014

Erbano, Marianna

Estudos morfoanatômicos e genéticos de *Salvia lachnostachys* Benth.
(Lamiaceae) / Marianna Erban – Curitiba, 2014.

100 f. : il (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Élide Pereira dos Santos

Coorientador: Dr. Guilherme Schnell e Schühli

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Código de barras de DNA. 2. Labiatae. 3. *matK*. 4. *rbcL*.
5. Variabilidade genética. I. Santos, Élide Pereira dos. II. Schühli,
Guilherme Schnell e. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

TERMO DE APROVAÇÃO


MARIANNA ERBANO

Título: “ESTUDOS MORFOANATÔMICOS E GENÉTICOS DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE)”

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof^a. Dr^a. Elide Pereira dos Santos
Orientadora


Prof^a. Dr^a. Marcia do Rocio Duarte
Universidade Federal do Paraná


Prof^a. Dr^a. Tatiana Teixeira de Souza Chies
Universidade Federal do Rio Grande do Sul


Prof^a. Dr^a. Bárbara Baêso Moura
Universidade Federal do Paraná


Prof^a. Dr^a. Viviane da Silva Pereira
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 21 de março de 2014.

A Deus, por sempre estar presente.

Aos meus pais, Gilberto (*in memorium*) e Nílvea.

Às minhas irmãs Larissa, Camila e Raísa.

E aos anjos enviados a mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mostrar os caminhos da vida.

À professora Élide, que sempre esteve ao meu lado com suas conversas e dicas maravilhosas que contribuíram para o meu trabalho e também para a vida.

Ao pesquisador Guilherme, que contribuiu e ensinou valores importantes ao longo da tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas que possibilitou a chance de poder me formar como Doutora.

Ao Programa Reuni/Capes com a ajuda de custo, assim, possibilitando a minha formação completa e integral.

Ao meu amigo Nilson, do Laboratório de Botânica da UFPR, que ao longo de vários anos, contribuiu tanto para o meu trabalho como para minha vida.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR que ajudou na montagem e análise ultraestrutural da planta.

Ao Walter, do Departamento de Bioquímica da UFPR, que me ajudou nos momentos alegres e tristes nas sequências de bases.

Aos meus pais, Gilberto (*in memorium*) e Nílvea, que se orgulham de mim e agradeço a Deus pela existência deles.

Às minhas irmãs, Larissa, Camila e Raísa, que de perto ou de longe, são meus amores e minhas alegrias.

Aos meus avós, Haroldo, Nelly e Maria e às minhas tias, Marlene, Josely e Joseane que são meus anjos da guarda.

Às pessoas amadas e amigas, Cristiane, Jislaine, Karla, Leopoldo, Lucimara, Marlene e Ronaldo, que são presentes enviados de Deus.

E a todos que acreditaram e me ajudaram de alguma forma nesta minha caminhada.

“A fé em Deus nos faz crer no incrível, ver
o invisível e realizar o impossível”.

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

Salvia lachnostachys Benth., pertencente à família Lamiaceae, é uma erva endêmica no Brasil, presente principalmente no Estado do Paraná. Sua composição química indica que essa espécie possui potencial para tornar-se matéria-prima para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios. Os objetivos deste trabalho foram analisar e descrever as características morfológicas e anatômicas diagnósticas e realizar testes microquímicos das partes aéreas vegetativas de *S. lachnostachys*, elaborar o código de barras de DNA, sequenciando duas regiões plastidiais do DNA (*matK* e *rbcL*) e estimar a variabilidade genética em três populações de *S. lachnostachys*. O material botânico foi coletado nos municípios de Curitiba, Palmeira e São Luiz do Purunã, no Estado do Paraná e depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB). Para as análises morfoanatômicas foram empregadas as técnicas clássicas para morfologia vegetal, testes microquímicos e preparo do material para análise em microscópio eletrônico de varredura. Para os estudos genéticos, foi realizada a extração do DNA de 73 indivíduos das três populações de *S. lachnostachys* e reações de amplificação através da PCR. Duas regiões plastidiais, *matK* e *rbcL*, foram sequenciadas para três indivíduos. Reações de amplificação pela técnica de PCR-ISSR foram realizadas utilizando-se nove iniciadores. Parâmetros para a avaliação da diversidade genética, incluindo análises de agrupamento, componentes principais (PCA), análise de variância molecular (AMOVA) e estrutura de populações foram empregados. *Salvia lachnostachys* é uma erva decumbente com ramos ascendentes que apresenta caule quadrangular, inflorescência terminal, brácteas persistentes e 7–17 verticilastros contendo 8–14 flores. O caule e a folha possuem caracteres anatômicos que correspondem ao gênero *Salvia*, evidenciando como característica anatômica diagnóstica para a espécie a organização dos feixes vasculares no pecíolo. No sequenciamento do DNA das duas regiões plastidiais, foram obtidos 807 pares de base para a região *matK* e 643 para a região *rbcL*, com similaridade de 99% com outras espécies do mesmo gênero. Para o estudo da variabilidade genética, foram amplificados 10–22 *loci* por iniciador, totalizando 155 bandas polimórficas (95,6%). O índice de Simpson de cada iniciador indicou uma média de 0,79 e os mais polimórficos foram (AG)₈YC e (AG)₈A. A porcentagem de bandas polimórficas entre populações foi, em média, 97,48%. Os índices de diversidade de Nei e de Shannon foram, em média, 0,2509 e 0,3982, respectivamente. Os indivíduos de Curitiba apresentaram maiores valores de variabilidade. Na AMOVA, a diferenciação genética interpopulacional foi 16,8% ($G_{ST} = 0,1678$) e intrapopulacional foi 81,76%, indicando uma variação genética majoritária intrapopulacional. Nas análises de agrupamento e PCA, os resultados foram consistentes e as três populações aparecem como distintas, assim como no estudo da estruturação populacional. A descrição morfoanatômica e o sequenciamento do DNA de duas regiões plastidiais de *S. lachnostachys* realizados contribuem para a identificação e o controle farmacognóstico dessa espécie com potencial medicinal. O resgate efetivo da diversidade genética dessa espécie, com a finalidade de propagação ou conservação em banco de germoplasma, deve priorizar os dois grupos de Palmeira.

Palavras-chave: Código de barras de DNA. Labiatae. *matK*. *rbcL*. Variabilidade genética.

ABSTRACT

Salvia lachnostachys Benth., belonging to the Lamiaceae family, is an endemic herb in Brazil, mainly present in Paraná State. Its chemical composition indicates that this species has potential to become raw material for the development of anti-inflammatory drugs. The aims of this study were to analyze and describe the morphological and anatomical diagnostic characteristics and carry out with microchemical tests of vegetative aerial parts of *S. lachnostachys*, elaborate the DNA barcode using two plastid regions (*matK* and *rbcL*) and to estimate the genetic variability in three populations of *S. lachnostachys*. The botanical material was collected in the cities of Curitiba, Palmeira and São Luiz do Purunã, in Paraná State and deposited at the Herbarium of the Federal University of Paraná (UPCB). For morphoanatomical analyzes classical techniques for plant morphology were used, for microchemical tests and for preparing the material for analysis in a scanning electron microscopy. For genetic studies, DNA extraction was performed in 73 individuals from three populations of *S. lachnostachys* and amplification reactions were carried using PCR. Two plastid regions, *matK* and *rbcL*, were sequenced for three individuals. Amplification reactions for ISSR-PCR were performed using nine primers. Parameters for the assessment of genetic diversity, including analysis of grouping, principal components (PCA), analysis of molecular variance (AMOVA) and population structure were employed. *S. lachnostachys* is a herb with petiolate leaves, terminal inflorescence, persistent bracts and glandular-villous corolla. Stems and leaves have anatomical characters that correspond to the genus *Salvia*. The anatomic diagnostic characteristic observed was the organization of vascular bundles of the petiole. In DNA sequencing of the two plastid regions, it was obtained 807 bp for the *matK* region and 643 for the *rbcL* region with 99% similarity with other species of the same genus. For the genetic variability study, 10-22 loci were amplified by primer and 155 polymorphic bands (95.6%) were formed. The Simpson index for each primer indicated an average of 0.79 and (AG)₈YC and (AG)₈A primers were the most polymorphic. The percentage of polymorphic bands among populations was on average 97.48%. The diversity index of Nei and Shannon were, on average, 0.2509 and 0.3982, respectively. The individuals from *Curitiba* showed higher variability. In the AMOVA, the interpopulation genetic differentiation was 16.8% ($G_{st} = 0.1678$) and intrapopulation was 81.76%, indicating a majority intrapopulation genetic variation. In the PCA and grouping analysis the results were consistent and all three populations appear as distinct as in the study of population structure. The morphoanatomical description and DNA sequencing of two plastid regions of *S. lachnostachys* contribute to the identification and pharmacognosy control of this species with medicinal potential. For the effective redemption of genetic diversity of this species, for the purpose of propagation or conservation in germplasm bank, priority should be given to two clades of *Palmeira*.

Key words: DNA Barcode. Genetic variability. Labiatae. *matK*. *rbcL*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL E OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ESPÉCIES DE <i>Salvia</i> L. (LAMIACEAE). O VELHO MUNDO APRESENTA OS INSETOS COMO POLINIZADORES, EXCETO NA ÁFRICA DO SUL (SETA). E NO NOVO MUNDO (BARRAS) POSSUEM COMO POLINIZADORES ALÉM DE INSETOS, OS PÁSSAROS	23
FIGURA 2	<i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE). A - PLANTA EM SEU HABITAT - CURITIBA, PARANÁ; B - DETALHE DA INFLORESCÊNCIA	25
FIGURA 3	ORIENTAÇÃO DOS INICIADORES DA REGIÃO <i>matK</i> DA ESPÉCIE <i>Arabidopsis thaliana</i> (AF144378)	28
FIGURA 4	ORIENTAÇÃO DOS INICIADORES DA REGIÃO <i>rbcL</i> DA ESPÉCIE <i>Arabidopsis thaliana</i> (AF144378)	28
FIGURA 5	LOCALIZAÇÃO DAS COLETAS DAS TRÊS POPULAÇÕES DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE) NO ESTADO DO PARANÁ (a = Palmeira; b = São Luiz do Purunã; c = Curitiba)	32
FIGURA 6	ÁREA DE ESTUDO DAS TRÊS POPULAÇÕES DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE) NO ESTADO DO PARANÁ (a = Palmeira; b = São Luiz do Purunã; c = Curitiba)	32
FIGURA 7	<i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE: A. HÁBITO; B. BRÁCTEA; C. FLOR EXIBINDO CÁLICE E COROLA BILABIADA; D. DETALHE DO INDUMENTO DO CÁLICE; E. DETALHE DO INDUMENTO DA COROLA; F. CÁLICE ABERTO MOSTRANDO O OVÁRIO E O NECTÁRIO; G. COROLA MOSTRANDO ESTAMES, ESTAMINÓDIOS, ESTILETE E ESTIGMA; H. ESTAMINÓDIOS; I. ESTAMES SEM FILAMENTOS; J. ESTILETE	46
FIGURA 8	<i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE. CAULE: A. ASPECTO GERAL; B. TRICOMA GLANDULAR PELTADO; C-E. TRICOMAS TECTORES; F. CUTÍCULA PLISSADA, ESTÔMATO E TRICOMAS GLANDULARES; G. TESTE POSITIVO PARA LIGNINA; H. ASPECTO GERAL DA SUPERFÍCIE; I. TESTE POSITIVO PARA COMPOSTOS FENÓLICOS. ABREVIATURAS: cf - COMPOSTO FENÓLICO, ct - CUTÍCULA, cv - CILINDRO VASCULAR, cx - CÓRTEX, ep - EPIDERME, es - ESTÔMATO, lg - LIGNINA, me - MEDULA, tc - TRICOMA CAPITADO, tp - TRICOMA PELTADO, tt - TRICOMA TECTOR	51

FIGURA 9	<p><i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE. CAULE: A. DETALHE DO CAULE; B. PORMENOR DA CUTÍCULA PLISSADA, EPIDERME E COLÊNQUIMA; C. CÓRTEX, BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA E FLOEMA; D. CILINDRO VASCULAR; E. DETALHE DO XILEMA. ABREVIATURAS: be - BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA, co - COLÊNQUIMA, ct - CUTÍCULA, cx - CÓRTEX, ep - EPIDERME, fl - FLOEMA, me - MEDULA, rp - RAIO PARENQUIMÁTICO, xi - XILEMA</p>	52
FIGURA 10	<p><i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE. PECÍOLO: A. ASPECTO GERAL; B, C. TRICOMA GLANDULAR PELTADO (C - MEV); D. TRICOMAS GLANDULAR CAPITADO E TECTORES (MEV); E. TESTE POSITIVO PARA LIGNINA; F. CUTÍCULA PLISSADA, EPIDERME E COLÊNQUIMA; G. SISTEMA VASCULAR. ABREVIATURAS: ca - CALOTA ESCLERENQUIMÁTICA, co - COLÊNQUIMA, ct - CUTÍCULA, ep - EPIDERME, fl - FLOEMA, fv - FEIXE VASCULAR, MEV - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, pf - PARÊNQUIMA FUNDAMENTAL, tc - TRICOMA CAPITADO, tt - TRICOMA TECTOR, xi - XILEMA</p>	53
FIGURA 11	<p><i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE. FOLHA, VISTA FRONTAL DA EPIDERME: A. SUPERFÍCIE ADAXIAL; B. TRICOMAS DA FACE ADAXIAL (MEV); C. SUPERFÍCIE ABAXIAL; D. ASPECTO GERAL DOS TRICOMAS NA FACE ABAXIAL (MEV); E. TRICOMA GLANDULAR PELTADO (MEV); F. TRICOMAS GLANDULARES CAPITADOS E TECTORES UNISSERIADOS (MEV); G, H. TRICOMAS GLANDULARES CAPITADOS (H - MEV); I, J, K. TRICOMAS TECTORES (I - MEV). ABREVIATURAS: es - ESTÔMATO, MEV - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, tc - TRICOMA GLANDULAR CAPITADO, tp - TRICOMA GLANDULAR PELTADO, tt - TRICOMA TECTOR</p>	54
FIGURA 12	<p><i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE. FOLHA: A. ASPECTO GERAL; B. MESOFILO; C,D. DETALHE DA EPIDERME E DO COLÊNQUIMA; E. SISTEMA VASCULAR E CALOTA ESCLERENQUIMÁTICA; F. TESTE POSITIVO PARA TERPENOIDES. ABREVIATURAS: ca - CALOTA ESCLERENQUIMÁTICA, co - COLÊNQUIMA, ct - CUTÍCULA, ep - EPIDERME, epi - EPIDERME NA FACE ABAXIAL, eps - EPIDERME NA FACE ADAXIAL, es - ESTÔMATO, fl - FLOEMA, fv - FEIXE VASCULAR, pe - PARÊNQUIMA ESPONJOSO, pf - PARÊNQUIMA FUNDAMENTAL, pp - PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, xi - XILEMA</p>	55
FIGURA 13	<p>GEL DE ELETROFORESE DE AMOSTRAS DE DNA GENÔMICO DE 23 INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO DE CURITIBA DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE) .</p>	56

FIGURA 14	GEL DE ELETROFORESE DE AMOSTRAS DE DNA GENÔMICO DE 24 INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO DE PALMEIRA DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE)	56
FIGURA 15	GEL DE ELETROFORESE DE AMOSTRAS DE DNA GENÔMICO DE 26 INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO DE SÃO LUIZ DO PURUNÃ DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE)	56
FIGURA 16	PRODUTOS DA PCR DAS REGIÕES <i>matK</i> (A) e <i>rbcL</i> (B) DAS POPULAÇÕES DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE) (3 - INDIVÍDUO DE CURITIBA; 26 - INDIVÍDUO DE PALMEIRA; 55 - INDIVÍDUO DE SÃO LUIZ DO PURUNÃ; CP - CONTROLE POSITIVO; CN - CONTROLE NEGATIVO)	57
FIGURA 17	TRECHO DO ELETROFEROGRAMA DA REGIÃO <i>matK</i> DA POPULAÇÃO DE PALMEIRA DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE). (AS BARRAS AZUIS SUPERIORES INDICAM O ÍNDICE DE CONFIABILIDADE; OS NÚMEROS EM AZUL ABAIXO DAS SEQUÊNCIAS INDICAM A QUANTIDADE DE BASES NITROGENADAS E OS PICOS EM CORES DIFERENTES INDICAM AS BASES NITROGENADAS)	57
FIGURA 18	SEQUÊNCIA DE BASES OBTIDA NO CONSENSO DA REGIÃO <i>matK</i> DE CADA INDIVÍDUO PRESENTE NAS POPULAÇÕES DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE). (A - CURITIBA; B - PALMEIRA; C - SÃO LUIZ DO PURUNÃ; LETRAS EM VERMELHO: LOCAIS DAS BASES DIVERGENTES NAS POSIÇÕES 29, 128 E 304, RESPECTIVAMENTE)	58
FIGURA 19	TRECHO DO ELETROFEROGRAMA DA REGIÃO <i>rbcL</i> DA POPULAÇÃO DE PALMEIRA DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE). (AS BARRAS AZUIS SUPERIORES INDICAM O ÍNDICE DE CONFIABILIDADE; OS NÚMEROS EM AZUL ABAIXO DAS SEQUÊNCIAS INDICAM A QUANTIDADE DE BASES NITROGENADAS E OS PICOS EM CORES DIFERENTES INDICAM AS BASES NITROGENADAS)	59
FIGURA 20	SEQUÊNCIA DE BASES OBTIDAS NO CONSENSO DA REGIÃO <i>rbcL</i> DAS TRÊS POPULAÇÕES DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE)	59
FIGURA 21	GEL DE ELETROFORESE APRESENTANDO O PADRÃO DAS BANDAS PCR-ISSR GERADAS COM O INICIADOR (CTC) ₄ RC DA ESPÉCIE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE). A - CURITIBA; B - PALMEIRA; C - SÃO LUIZ DO PURUNÃ. (9-15: INDIVÍDUOS DE CURITIBA; 37-43: INDIVÍDUOS DE PALMEIRA; 47-5: INDIVÍDUOS DE SÃO LUIZ DO PURUNÃ; M: MARCADOR: 2072-300 pb)	60

FIGURA 22	ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DE DNA NO SOFTWARE GELANALYZER, MOSTRANDO AS BANDAS FORMADAS E SUAS QUANTIDADES (A), O TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE DNA (B) E A INTENSIDADE DAS MESMAS (C) PARA O ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA COM <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE	62
FIGURA 23	RELAÇÃO GENÉTICA DE 73 INDIVÍDUOS DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE) BASEADA NO MARCADOR ISSR, AMBOS REALIZADOS POR ANÁLISE UPGMA	64
FIGURA 24	RELAÇÃO GENÉTICA DE 73 INDIVÍDUOS DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE) BASEADA NO MARCADOR ISSR. ANÁLISE DO COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) AGRUPADA POR POPULAÇÃO	65
FIGURA 25	GRÁFICO MOSTRANDO O NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE POPULAÇÕES ESTUDADAS, SEGUNDO A ESTATÍSTICA DE EVANNO, REGNAUT E GOUDET (2005)	65
FIGURA 26	ESTRUTURA DAS TRÊS POPULAÇÕES DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE) COM MARCADOR ISSR. A - CURITIBA; B - PALMEIRA; C - SÃO LUIZ DO PURUNÃ. A LINHA PRETA REPRESENTA A SEPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS PRINCIPAIS	66

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1	LOCALIZAÇÕES E AMOSTRAGEM DAS POPULAÇÕES DE <i>Salvia lachnostachys</i> COLETADAS NO ESTADO DO PARANÁ PARA O ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA	33
QUADRO 2	TESTES MICROQUÍMICOS EMPREGADOS NOS CORTES DO CAULE E DA FOLHA DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE	35
QUADRO 3	REGIÕES CODIFICADORAS PARA O SEQUENCIAMENTO E SUAS RESPECTIVAS SEQUÊNCIAS DE INICIADORES UTILIZADOS PARA <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE. (Y = C ou T)	38
QUADRO 4	RELAÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) DA REGIÃO <i>matK</i> PARA <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE	39
QUADRO 5	COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES PRESENTES NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PARA O ESTUDO DO CÓDIGO DE BARRAS DE DNA COM <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE	40
QUADRO 6	COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES PRESENTES NA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) PARA O ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA COM <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE	42
QUADRO 7	RELAÇÃO DOS INICIADORES (<i>PRIMERS</i>) UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) PARA O MARCADOR ISSR NO ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA COM <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE. (Y = C ou T; R = A ou G)	42
QUADRO 8	ANÁLISES PARA O ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA COM MARCADORES ISSR DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE	44
TABELA 1	RELAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE INDIVÍDUOS AMPLIFICADOS, INDIVÍDUOS DESCARTADOS POR FALTA DE AMPLIFICAÇÃO E INDIVÍDUOS EMPREGADOS NAS ANÁLISES PARA CADA INICIADOR PARA O ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA COM <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH., LAMIACEAE.	61
TABELA 2	SEQUÊNCIA DOS NOVE INICIADORES, NÚMERO DE BANDAS, NÚMERO E PORCENTAGEM DE BANDAS POLIMÓRFICAS E ÍNDICE DE SIMPSON DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE).	63
TABELA 3	VARIABILIDADE GENÉTICA DAS TRÊS POPULAÇÕES DE <i>Salvia lachnostachys</i> BENTH. (LAMIACEAE).	63

QUADRO 9	DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE ESPÉCIES DE <i>Salvia</i> BRASILEIRAS DA SEÇÃO ULIGINOSAE	67
----------	--------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 FAMÍLIA LAMIACEAE MARTINOV	20
2.1.1 Gênero <i>Salvia</i> L.	22
2.1.1.1 <i>Salvia lachnostachys</i> Benth.	25
2.2 CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA	26
2.2.1 Código de Barras de DNA	26
2.2.2 Variabilidade Genética	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	31
3.2 PREPARO DO MATERIAL	33
3.3 ESTUDO MORFOANATÔMICO	33
3.3.1 Preparo de Lâminas Semipermanentes	34
3.3.2 Preparo de Lâminas Permanentes	34
3.3.3 Testes Microquímicos	35
3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	35
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA	36
3.4.1 Extração do DNA	36
3.4.2 Código de Barras de DNA	37
3.4.2.1 Amplificação das Regiões <i>matK</i> e <i>rbcl</i>	38
3.4.2.2 Reação de Sequenciamento	39
3.4.2.3 Análise de Dados	40
3.4.3 Variabilidade Genética	41
3.4.3.1 Amplificação do DNA pela Técnica de PCR-ISSR	41
3.4.3.2 Análise de Dados	43
4 RESULTADOS	45
4.1 ESTUDO MORFOLÓGICO	45
4.2 ESTUDO ANATÔMICO	47
4.2.1 Caule	47
4.2.2 Folha	48

4.2.3 Testes Microquímicos	50
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA	56
4.3.1 Extração do DNA	56
4.3.2 Código de Barras de DNA	57
4.3.2.1 Sequenciamento da Região <i>matK</i>	57
4.3.2.2 Sequenciamento da Região <i>rbcL</i>	59
4.3.3 Variabilidade Genética	60
4.3.3.1 Amplificação do DNA pela Técnica PCR-ISSR	60
4.3.3.2 Análise dos Iniciadores	61
4.3.3.3 Variação Gênica	63
4.3.3.4 Estrutura Genética das Populações	64
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO	92

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, os vegetais estão presentes na vida do homem como meio restaurador da saúde, e são utilizados por médicos interessados em plantas medicinais. Assim, morfologia vegetal e propriedades medicinais estavam implicitamente relacionadas e, juntas, constituíram a força propulsora para o desenvolvimento da classificação vegetal (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2004). As plantas são uma fonte de produtos naturais biologicamente ativos e muitas vezes servem de modelos para a síntese de um grande número de fármacos ou para a produção de fitoterápicos (WALL; WANI, 1996).

A biodiversidade inclui todas as formas de vida e os genes contidos em cada indivíduo, suas inter-relações e ecossistemas associados, apresentando uma distribuição desigual dos seus componentes no espaço geográfico com quantidade de espécies variáveis num dado ambiente (HEYWOOD; IRIONDO, 2003).

Há uma necessidade urgente de caracterizar e conservar os ecossistemas em que as diferentes espécies ocorrem e interagem. O Brasil possui uma das maiores diversidades vegetais do mundo com 43.894 espécies catalogadas (LISTA de Espécies da Flora do Brasil, 2014) correspondendo entre 13–17% da flora mundial (LEWINSOHN; PRADO, 2000).

Nos últimos anos, houve avanços em relação ao conhecimento taxonômico das angiospermas brasileiras, principalmente nas Regiões Sul, Sudeste e Nordeste, entretanto, para algumas áreas da Floresta Atlântica ainda os estudos são insuficientes (MARTINELLI *et al.*, 2008). Há casos em que espécies descritas recentemente já se encontram ameaçadas de extinção (SOBRAL; STEHMANN, 2009).

A perda de informações sobre o uso medicinal das plantas pela população, acumuladas por milênios, é denominada de “queima da biblioteca”. A conservação etnobotânica é necessária para proteger o conhecimento milenar pelas diversas comunidades que as empregam (SCHULTES, 1988). Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foi estudada com intuito de buscar compostos bioativos (GUERRA; NODARI, 2010) e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas quanto as suas propriedades medicinais (GARCIA *et al.*, 1996), revelando uma necessidade de

buscar alternativas para superar a dependência externa em relação a fármacos e às indústrias multinacionais (BERMUDEZ, 1995).

Dessa forma, visando buscar novos produtos da biodiversidade brasileira, foram iniciados os estudos químicos com *Salvia lachnostachys* Benth., da família Lamiaceae (KASSUYA *et al.*, 2009). Essa família possui espécies empregadas como aromáticas e ornamentais, na perfumaria, na culinária, na produção de refrescos e na medicina popular (NUÑEZ; OBÓN DE CASTRO, 1992; HARLEY *et al.*, 2004; OLIVEIRA; KFFURI; CASALI, 2010).

O gênero *Salvia* L., cosmopolita, é um dos maiores em número de espécies de fanerógamas, podendo ser arbustos ou ervas perenes ou anuais. Algumas espécies de *Salvia* são empregadas como tempero, ornamental e/ou medicinal (HARLEY *et al.*, 2004) e apresentam diversas atividades farmacológicas comprovadas, entre elas, anti-inflamatória (HOSSEINZADEH; HADDAKHODAPARAST; ARASH, 2003), gastroprotetora (MAYER *et al.*, 2009), antiplaquetária e antitrombótica (FAN *et al.*, 2010). Os principais componentes químicos presentes em várias espécies de *Salvia* são óleos essenciais e terpenoides (BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2007).

No Brasil ocorrem 61 espécies de *Salvia* (HARLEY *et al.*, 2013), entretanto os únicos estudos fitoquímicos ou farmacológicos realizados com as espécies brasileiras foram com *Salvia uliginosa* Benth., *S. splendens* Sellow ex Roem. & Schult. e *S. guaranitica* A.St.-Hil. ex Benth. Essas espécies são amplamente cultivadas como ornamentais, principalmente na Europa, e as análises foram realizadas com extratos de plantas provenientes desses cultivos (VIOLA *et al.*, 1997; VALVERDÚ *et al.*, 2005; FONTANA; SAVONA; RODRÍGUEZ, 2006; PINTO, 2012).

Salvia lachnostachys é uma erva perene, nativa, encontrada no Estado do Paraná e nas fronteiras com os estados de São Paulo e Santa Catarina (JIMENA; FRANÇA; SOBRAL, 2009; ERBANO *et al.*, 2012). No estudo com extrato de folhas de *S. lachnostachys*, coletado na cidade de Curitiba, PR, na fração hexânica, foram encontrados terpenos com importante atividade farmacológica (ERBANO *et al.*, 2012).

A diversidade genética mede a variação genética existente em uma determinada espécie (NEI, 1973). Assim, marcadores genéticos são capazes de detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos através de um *loci* ou de uma região cromossômica (NODARI; GUERRA, 2004). Os vegetais podem ser

caracterizados tanto pela estimativa de índices genéticos como através da organização da variabilidade genética entre as populações e dentro delas (GEPTS; BLISS, 1985). Essas informações têm diversas finalidades, entre elas a conservação genética (NODARI; GUERRA, 2004).

A perda da diversidade genética está associada à destruição da vegetação nativa e à fragmentação dos ecossistemas. Esta pode ser resultante do crescimento populacional das metrópoles, da atividade agrícola e da criação de gado, somado aos estresses ambientais como a poluição e às mudanças climáticas globais (BAUR; SCHMID, 1996). A fragmentação do hábitat é considerada uma das razões principais da diminuição da diversidade vegetal, influenciando diretamente na dispersão do organismo, reduzindo o fluxo gênico, aumentando a endogamia e por conseguinte, afetando a capacidade competitiva e adaptativa das espécies (HEYWOOD; IRIONDO, 2003; OOSTERMEIJER; LUIJTEN; DEN NIJS, 2003).

Marcadores moleculares baseados em Sequências Simples de Repetições entre microssatélites (ISSR) têm sido empregados com sucesso nas estimativas de variabilidade genética e se tornaram uma importante ferramenta para o estudo de populações, incluindo espécies de Lamiaceae aromáticas e medicinais, como em *Hesperozygis ringens* Benth. (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006), *Salvia miltiorrhiza* Bunge (SONG *et al.*, 2010), *Thymus daenensis* Celak. (RAHIMMALEK *et al.*, 2009) e em diversas espécies de *Cunila* D. Royen ex L. (AGOSTINI; ECHEVERRIGARAY; SOUZA-CHIES, 2008), *Mentha* L. (GOBERT *et al.*, 2006) e *Stachys* L. (KOCHIEVA *et al.*, 2006).

Segundo a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, para a autenticação da droga vegetal, os requisitos principais são as análises morfológicas (macroscópicas) e anatômicas (microscópicas) (BRASIL, 2004). Entretanto, quando a identificação botânica se torna difícil ou impossível devido à presença de pequenas amostras ou fragmentos do vegetal, é necessário utilizar uma ferramenta de identificação mais eficiente como os sequenciamentos das regiões plastidiais: *matK* e *rbcL*, preconizadas pelo CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*) como código de barras das plantas terrestres (VALENTINI; POMPANON; TABERLET, 2008; CBOL, 2009).

Os testes microquímicos indicam a localização química dos produtos do metabolismo primário (carboidratos, lipídeos e proteínas) ou secundário (alcaloides,

compostos fenólicos, terpenoides) presentes no interior da planta (COSTA; PROENÇA DA CUNHA, 2000).

Visto que *S. lachnostachys* é uma espécie nativa no Brasil, e que estudos fitoquímicos e farmacológicos conduzidos com extratos dessa planta detectaram a presença de compostos com potencial medicinal, o presente trabalho visa contribuir para sua correta identificação, caracterizar e estimar os níveis de variabilidade genética inter e intrapopulacional.

1.1 OBJETIVOS

- Analisar e descrever as características morfológicas e anatômicas e realizar testes microquímicos das partes aéreas vegetativas de *Salvia lachnostachys*;
- Disponibilizar o código de barras de DNA, sequenciando duas regiões do DNA plastidial (*matK* e *rbcL*);
- Estimar a variabilidade genética em três populações de *S. lachnostachys*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA LAMIACEAE MARTINOV

A família Lamiaceae Martinov abrange 236 gêneros e 7.173 espécies e é distribuída em oito subfamílias, nas quais Nepetoideae se enquadra. Essa subfamília apresenta três tribos que são: Elsholtzieae, Mentheae e Ocimeae. A tribo Mentheae possui três subtribos: Salviinae, Menthinae e Nepetinae. O gênero *Salvia* está incluído na subtribo Salviinae (HARLEY *et al.*, 2004).

As espécies da família possuem uma distribuição cosmopolita, ausentes em regiões mais gélidas ou de altitudes elevadas (HARLEY *et al.*, 2004). No Brasil, existem 34 gêneros, sendo quatro endêmicos e 498 espécies, das quais 334 são endêmicas (HARLEY *et al.*, 2013), sendo que 236 espécies estão no Domínio Atlântico (JIMENA; FRANÇA; SOBRAL, 2009). Estão distribuídas em todas as regiões do Brasil, principalmente, nas regiões montanhosas e raramente, no norte do país (GIULIETTI *et al.*, 2005).

Representantes dessa família apresentam hábitos muito variados, mais comumente arbustos, subarbustos, ervas, raro trepadeiras ou árvores, que podem ser perenes, bienais ou anuais. As folhas são opostas decussadas ou verticiladas, simples ou compostas, podendo ser inteiras, denteadas ou lobadas, pecioladas ou sésseis e sem estípulas (HARLEY *et al.*, 2004).

As inflorescências geralmente são vistosas, axilares ou terminais, com ramos cimosos. As flores são andróginas, diclamídeas e zigomorfas. O cálice possui cinco sépalas unidas e persistentes, podendo ser tubuloso, campanulado ou infundibuliforme, com o ápice bilabiado ou 5–10 denteado ou lobado. A corola tem cinco pétalas unidas, podendo ser tubulosa, campanulada ou infundibuliforme, com o ápice bilabiado. O androceu possui quatro ou dois estames que estão inseridos no tubo da corola, os filetes são livres entre si, retos ou curvos e as anteras apresentam uma ou duas tecas. O gineceu é bicarpelar, sincárpico, com quatro lóculos, dois óvulos em cada carpelo, o ovário é súpero e apresenta um estilete do tipo ginobásico e dois estigmas. O fruto, nas Lamiaceae, é denominado de núcula

(BENTHAM, 1832-1836; HARLEY *et al.*, 2004). A polinização é efetuada por animais, principalmente por diversos tipos de insetos (HARLEY *et al.*, 2004).

As espécies dessa família podem produzir muitas variedades de compostos secundários, entretanto são famosos por apresentarem óleos essenciais presentes nos tricomas glandulares, nas superfícies de folhas e nas inflorescências (HARLEY *et al.*, 2004). Os óleos voláteis consistem principalmente de monoterpenoides, diterpenoides e sesquiterpenoides. Uma das classes de terpenoides característicos de Lamiaceae são os diterpenoides. Muitos destes compostos apresentam atividades biológicas, tais como antibacteriana e antifúngica, além de possuir função ecológica nas plantas (RICHARDSON, 1992; HARLEY *et al.*, 2004). Os ácidos triterpênicos (ácidos ursólico e oleanólico) também se encontram nessa família (BRUNETON, 2001). Estudos com espécies de Lamiaceae revelam que esses compostos químicos podem estar envolvidos nas atividades antiedematogênica (COSTA *et al.*, 2008) e antifúngica (LEMES; FERRI; LOPES, 2011), além de apresentarem atividades anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral (DALLA-VECHIA; GNOATTO; GOSMAMM, 2009), antineoplásica (TOKUDA *et al.*, 1986) e hepatoprotetora (SARASWAT *et al.*, 1996). As Lamiaceae também produzem diversos constituintes fenólicos distribuídos na planta em grandes concentrações, como os ésteres do ácido cafeico, a exemplo do ácido rosmarínico (RICHARDSON, 1992; HARLEY *et al.*, 2004). Este último possui diversas ações farmacológicas, tais como antibacteriana, anticomedogênica, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e neuroprotetora (PETERSEN, 1997).

Essa família se destaca também por sua importância econômica e é amplamente empregada com propósitos culinários, como por exemplo: *Ocimum basilicum* L. (alfavaca), *Origanum vulgare* L. (orégano), *Mentha x piperita* L. (hortelã-pimenta), *Mentha pulegium* L. (poejo), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Salvia officinalis* L. (sálvia) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho); na perfumaria como *Lavandula angustifolia* Mill. (lavanda, alfazema); na preparação de bebidas, refrescos ou chás como *Melissa officinalis* L. (erva-cidreira), *Mentha* spp. (hortelã) e *Salvia hispanica* L. (sálvia, chia); na ornamentação como *O. basilicum*, *Salvia guaranitica* A.St.-Hil. ex Benth. (sálvia-azul) e *Salvia splendens* Sellow ex Roem. & Schult. (sangue-de-adão) (HARLEY *et al.*, 2004), e na medicina popular como *M. piperita* que é utilizada externamente como analgésico em reumatismos e inalada para o alívio da congestão nasal e sinusite (NUÑEZ; OBÓN DE CASTRO, 1992). A população nativa

da América do Norte utiliza a hortelã-pimenta para o tratamento de distúrbios neurológicos, respiratórios, cardíacos e gastrointestinais, sendo este último uso também empregado pela população da América do Sul (HEINRICH, 1992). Na região de Rosário da Limeira (Minas Gerais-Brasil), *Leonurus sibiricus* L. (macaé) é empregado contra a bronquite, *M. officinalis* como digestivo e calmante, *Mentha arvensis* L. (vick) contra congestão nasal, *M. pulegium* como calmante e contra a gripe e *O. basilicum* na constipação (OLIVEIRA; KFFURI; CASALI, 2010).

2.1.1 Gênero *Salvia* L.

O gênero *Salvia* L. deriva do latim *salvare* e significa curar devido às suas virtudes (LARRAÑAGA, 1923). É o maior gênero da família, apresentando em torno de 900 espécies, sendo que o continente americano abriga mais da metade, e destas quase a totalidade pertence ao subgênero *Calosphace* (HARLEY *et al.*, 2004), o qual é monofilético e exclusivo das Américas (WALKER *et al.*, 2004).

Salvia é encontrado nas regiões com clima subtropical e temperado e apresentado como arbustos ou ervas anuais ou perenes. Os principais centros de diversidade do gênero estão no sudoeste da Ásia e nas Américas Central e do Sul (EPLING, 1937, 1939; HARLEY *et al.*, 2004). Na América do Sul (FIGURA 1) são encontradas em torno de 210 espécies (CLAßEN-BOCKHOFF; WESTER; TWERASER, 2003), no Brasil há 61 espécies, sendo que 47 são endêmicas, distribuídas nas regiões: Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) (HARLEY *et al.*, 2013).

As folhas são simples denteadas ou lobadas com inflorescências terminais ou axilares. Possuem brácteas que podem ser caducas ou persistentes. O cálice é persistente, ovalado-tubuloso, bilabiado, sendo que o lábio superior é tridentado ou inteiro e o lábio inferior é bifido, com 9–15 nervações. A corola é bilabiada de coloração que pode ser branca, amarela, roxa, vermelha ou azul. O lábio superior é bilabiado ou inteiro e o inferior é trilobado. O androceu possui dois estames férteis com filete curto, 1–2 tecas férteis, conectivo alongado e expandido formando uma alavanca. O gineceu é composto de ovário bicarpelar com quatro lóculos, estilete

ginobásico e o estigma bífido (BENTHAM, 1832-1836; EPLING; TOLEDO, 1943; HARLEY *et al.*, 2004).

Nas espécies do gênero *Salvia* ocorre um tipo de polinização peculiar devido ao estame apresentar um mecanismo de alavanca constituído por um curto filete, um conectivo alongado separando as duas tecas, e, em algumas espécies, apenas uma teca é fértil (CLAßEN-BOCKHOFF; WESTER; TWERASER, 2003; HARLEY *et al.*, 2004). O ramo anterior que contém a teca estéril forma uma barreira ao acesso do néctar. Enquanto o polinizador suga o néctar, a teca fértil, presente no ramo posterior do conectivo, encosta no dorso do polinizador liberando os grãos de pólen. Quando o inseto for visitar outra flor, o pólen será depositado no seu estigma ocorrendo a polinização (CLAßEN-BOCKHOFF; WESTER; TWERASER, 2003; CLAßEN-BOCKHOFF; CRONE; BAIKOVA, 2004; CLAßEN-BOCKHOFF *et al.*, 2004; WESTER; CLAßEN-BOCKHOFF, 2006, 2007).

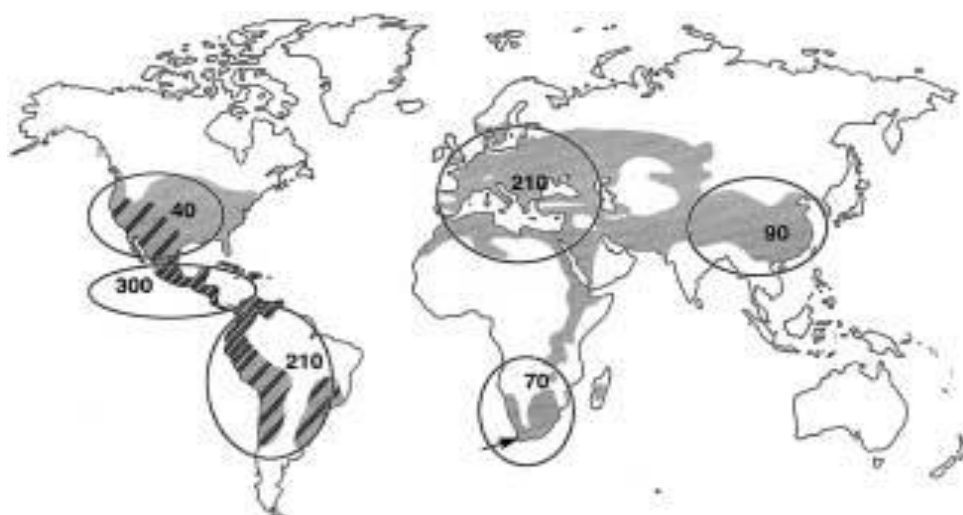


FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL E OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ESPÉCIES DE *Salvia* L. (LAMIACEAE). O VELHO MUNDO APRESENTA OS INSETOS COMO POLINIZADORES, EXCETO NA ÁFRICA DO SUL (SETA). E NO NOVO MUNDO (BARRAS) POSSUEM COMO POLINIZADORES ALÉM DE INSETOS, OS PÁSSAROS
FONTE: Claßen-Bockhoff; Wester; Tweraser (2003)

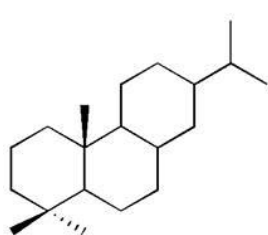
As espécies de *Salvia* são utilizadas na culinária (RICHARDSON, 1992) e extensamente cultivadas como plantas ornamentais (LARRAÑAGA, 1923).

Na medicina popular, *Salvia procurrens* Benth. (= *S. hederacea* Larrañaga) e *Salvia uliginosa* Benth. (= *S. lanceolata* Larrañaga) são empregados como carminativo, estimulante ou tônico (LARRAÑAGA, 1923). *Salvia hispanica* é utilizado nas Américas Central e do Sul contra distúrbios gastrointestinais e febre, como sedativo e infecções de pele (MORTON, 1981), problemas respiratórios e urinários

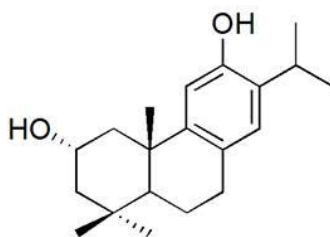
(CAHILL, 2003). Nas Ilhas Canárias, *Salvia canariensis* L. é prescrita como diurético (DARIAS *et al.*, 1986) e na Itália, a decocção das folhas de *Salvia pratensis* L. servida após as refeições acalma dores de cabeça, além de ser usada para lavagem bucal aliviando dores de dente (LEPORATTI; PAVESI; POSOCCO, 1985). *Salvia officinalis* é empregado como antidiabético (BAILEY; DAY, 1989). E a espécie *S. miltiorrhiza* é empregada para o tratamento de doenças cardiovasculares, neurovasculares e hiperlipidêmicas (CHENG, 2006a, 2006b, 2007).

Representantes de *Salvia* apresentam diversas atividades farmacológicas, entre elas hipoglicemiante (JIMENEZ *et al.*, 1986), espasmolítica (TADDEI *et al.*, 1988), analgésica, antiepiléptica, antipirética, antiulcerogênica e tranquilizante (MAKLAD *et al.*, 1999), anticonceptiva e anti-inflamatória (HOSSEINZADEH; HADDAKHODAPARAST; ARASH, 2003), antioxidante (KAMATOUA *et al.*, 2005), antibacteriana (DELAMARE *et al.*, 2007) e gastroprotetora (MAYER *et al.*, 2009). Em estudos com *S. miltiorrhiza*, Fan e colaboradores (2010) observaram que o ácido salvianólico A (SAA) possui atividades antiplaquetária e antitrombótica.

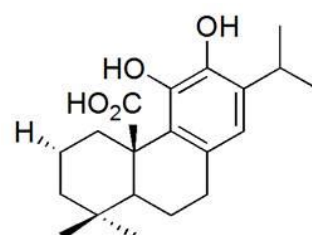
As espécies de *Salvia* são ricas em ácido fenólico como o ácido rosmarínico, glicosídeos, flavonoides, antocianinas, cumarinas e terpenoides (monoterpenos, diterpenos e triterpenos) (BRUNETON, 2001; BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2007). Em uma revisão de diterpenoides no gênero *Salvia*, Rodríguez-Hahn e colaboradores (1992) sugeriram que esses compostos estão presentes na maioria das espécies, principalmente diterpenos que apresentam um esqueleto do tipo abietano [1] como salviol [2] e salvina [3].



1



2



3

No estudo químico do óleo essencial de *S. lachnostachys* e *S. melissiflora* Benth. foi observada a presença de compostos alifáticos (76,2% e 48,8% do total do óleo, respectivamente) e de uma fração sesquiterpênica (12% e 33,4%, respectivamente). Para *S. lachnostachys*, os principais constituintes foram ácido

dodecanoico (61,6%) e ácido hexanoico (7,9%); e para *S. melissiflora* foram ácido linoleico (27,5%), ácido hexanoico (10,6%) e óxido de cariofileno (9,0%) (KASSUYA *et al.*, 2009).

Do ponto de vista químico e farmacológico, as espécies de *Salvia* nativas do Brasil são praticamente desconhecidas.

2.1.1.1 *Salvia lachnostachys* Benth.

Salvia lachnostachys (FIGURA 2) é endêmica no Brasil, presente na Mata Atlântica dos Estados de Paraná, Santa Catarina e São Paulo (HARLEY *et al.*, 2013). No Paraná, ocorre nos campos do primeiro e segundo planaltos paranaenses (JIMENA; FRANÇA; SOBRAL, 2009), citada também para a savana gramínea lenhosa (campo limpo/sujo) no Parque Estadual de Vila Velha (CERVI *et al.*, 2007).

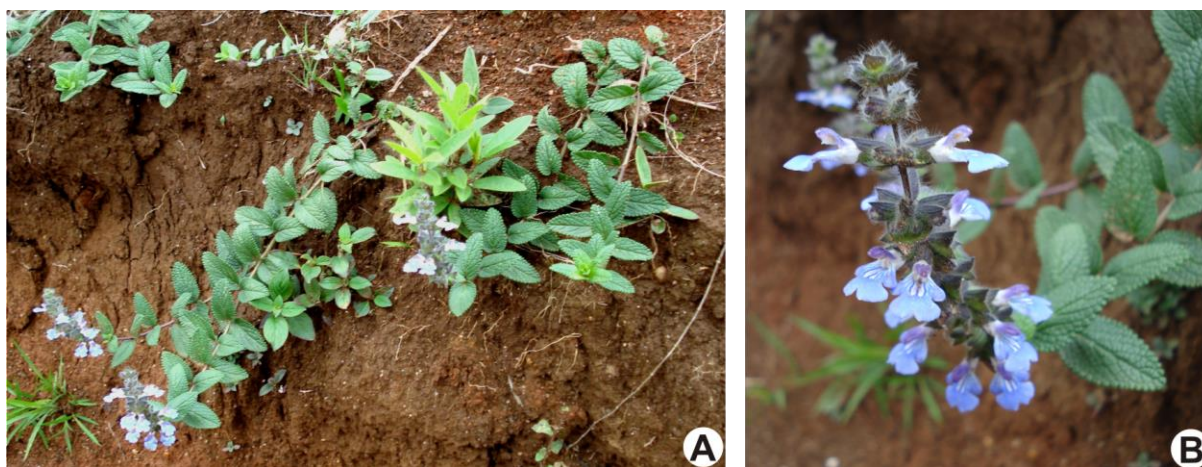


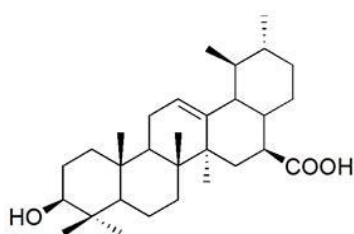
FIGURA 2 - *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE). A - PLANTA EM SEU HABITAT - CURITIBA, PARANÁ; B - DETALHE DA INFLORESCÊNCIA
FONTE: O autor (18/03/2010)

Salvia lachnostachys é considerada uma erva ou subarbusto perene, prostrada de 40–70 cm de altura. Suas folhas são pecioladas, revestidas de tricomas curtos e longos, de formato oblongo-ovalado, ápice obtuso ou arredondado e base arredondada, com margem crenada e brácteas persistentes. O cálice é tubuloso-campanulado, com tricomas glandulares, bilabiado, lábio superior mucronado, 5-nervado e o inferior bífido com os lobos agudos. A corola é bilabiada, tubuloso-campanulada e de coloração azul (BENTHAM, 1832-1836; EPLING, 1939; EPLING;

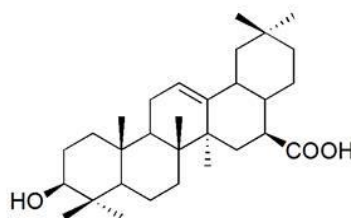
TOLEDO, 1943). O período de floração é de novembro a abril e o de frutificação é de fevereiro a maio. De julho a setembro ocorre o período de estagnação na produção de folhas (MARTINI *et al.*, 2010).

Em estudos farmacológicos preliminares com o extrato de *S. lachnostachys* foram observados o envolvimento do sistema gabaérgico na atividade ansiolítica em camundongos (ALMEIDA *et al.*, 2010) e a atividade anti-inflamatória nos parâmetros de edema e migração celular (PICCINELLI *et al.*, 2012).

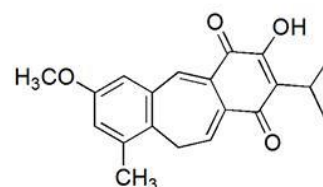
Estudos realizados com as folhas secas e moídas de *S. lachnostachys* foram encontrados, na fração hexânica, dois ácidos triterpênicos hidratados: o ácido ursólico [4] e o ácido oleanólico [5] e um norditerpeno denominado fruticulina A [6] (ERBANO *et al.*, 2012).



4



5



6

2.2 CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

2.2.1 Código de Barras de DNA

Os dados de bioquímica, comportamento, fisiologia e morfologia dos organismos são importantes, mas apresentam limitações, e podem ser complementados com estudos moleculares (FREELAND, 2005). O sequenciamento de DNA é uma ferramenta útil para a identificação taxonômica das espécies (SCOTLAND *et al.*, 2003; SEBERG *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2011), principalmente quando há dificuldade de analisar morfologicamente a planta (VALENTINI; POMPANON; TABERLET, 2008).

Em 2004, foi fundada uma iniciativa internacional com o intuito de desenvolver o código de barras de DNA como um padrão global para a identificação de espécies biológicas denominada de *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL). Após várias conferências mundiais foram criados grupos de trabalho, incluindo o grupo “CBOL *Plant Working Group*” (CBOL, 2009).

O Brasil apresenta um consórcio de identificação molecular da biodiversidade chamado *Brazilian Barcode of Life* (BrBOL). Entre os projetos do BrBOL, há o de Identificação Molecular de Plantas, que está centrado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Esse projeto visa gerar um banco de dados com as sequências de bases de DNA das plantas terrestres de diferentes biomas brasileiros (BrBOL, 2014).

Em animais, a sequência de pares de bases do DNA da região mitocondrial denominada citocromo oxidase c (COI) é estabelecida como o fragmento universal para código de barras de DNA, sendo utilizado para identificar as espécies (HEBERT *et al.*, 2003).

Nas plantas terrestres, vários autores têm pesquisado regiões do DNA buscando estabelecer um código de barras padrão (SALAZAR *et al.*, 2003; NEWMASER; FAZEKAS; RAGUPATHY, 2006; LAHAYE *et al.*, 2008).

As condições necessárias para que uma região seja considerada marcador para o código de barras são: universalidade, qualidade da sequência, poder de discriminação entre as espécies e baixo custo (CBOL, 2009).

Na ausência de uma região única do DNA que possibilite a discriminação de todas as espécies de plantas terrestres, estudos estão sendo realizados buscando uma combinação mínima de marcadores de regiões diferentes (KRESS *et al.*, 2005; CHASE *et al.*, 2007; KRESS; ERICKSON, 2007; FAZEKAS *et al.*, 2008; CBOL, 2009; VIJAYAN; TSOU, 2010).

O grupo de trabalho com plantas do CBOL (2009) padronizou como código de barras para plantas terrestres as regiões plastidiais *matK* e *rbcL* (CBOL, 2009; VIJAYAN; TSOU, 2010).

O *matK* é uma região de aproximadamente 1.550 pares de bases que codifica a enzima maturase K (NEUHAUS; LINK, 1987). É uma região variável, com alto poder de discriminação, útil nas reconstruções filogenéticas tanto em níveis taxonômicos superiores (ordem e família), como inferiores (gênero e espécie) (CHASE *et al.*, 2007; LAHAYE *et al.*, 2008).

Devido à ampla variabilidade na região *matK* e problemas quanto à universalidade, diversos iniciadores foram desenhados (FAZEKAS *et al.*, 2008; LAHAYE *et al.*, 2008; FORD *et al.*, 2009; DUNNING; SAVOLAINEN, 2010; YU; XUE; ZHOU, 2011).

Dunning e Savolainen (2010) desenvolveram iniciadores específicos para espécies da ordem Lamiales (LAM_F e LAM_R) e o número de bases sequenciadas para esta região é cerca de 885 (FIGURA 3).

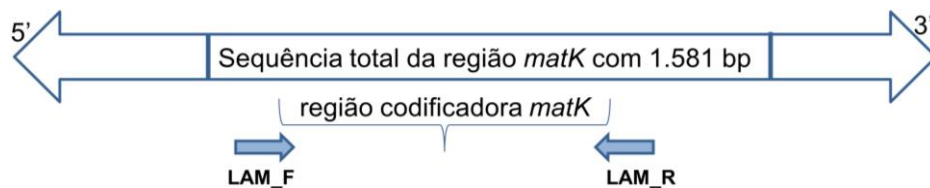


FIGURA 3 - ORIENTAÇÃO DOS INICIADORES DA REGIÃO *matK* DA ESPÉCIE *Arabidopsis thaliana* (AF144378)

Fonte: Dunning; Savolainen (2010)

O *rbcL* é um gene que codifica a maior subunidade da proteína, altamente conservada, denominada de rubilose-1,5-bifosfato carboxilase ou também conhecida como RuBisCo (ZURAWSKI *et al.*, 1981; KRESS; ERICKSON, 2007; FORD *et al.*, 2009). Essa região compreende aproximadamente 1.400 pares de bases (FORD *et al.*, 2009), entretanto empregando o iniciador *forward rbcL_f* (KRESS; ERICKSON, 2007) e o *reverse* 724R (FAY; SWENSEN; CHASE, 1997), a região contém aproximadamente 590 pares de base (FIGURA 4). O *rbcL* é útil para análises genéricas, não o sendo para níveis específicos (SOLTIS; SOLTIS, 1998).

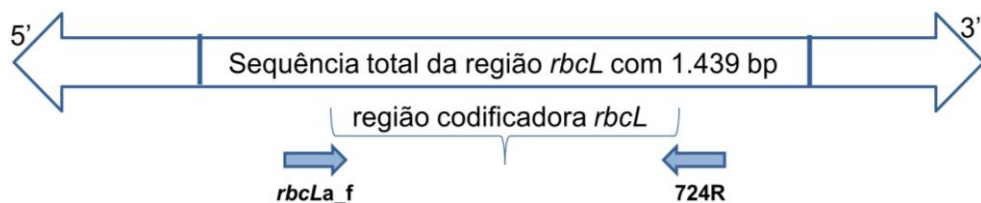


FIGURA 4 - ORIENTAÇÃO DOS INICIADORES DA REGIÃO *rbcL* DA ESPÉCIE *Arabidopsis thaliana* (AF144378)

Fontes: Fay; Swensen; Chase, 1997; Kress; Erickson, 2007

2.2.2 Variabilidade Genética

O conhecimento da variabilidade genética distribuído dentro e entre populações é de extrema importância para diversas aplicações (FREELAND, 2005), como nas ações de conservação e/ou formação de banco de germoplasmas (WU *et al.*, 2010; GRATIVOL *et al.*, 2011; XUE *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012; SOUZA; SOUZA; LIMA, 2013) e nas caracterizações molecular (LÜDTKE *et al.*, 2010) e farmacognóstica de plantas medicinais (KURANE; SHINDE; HARSULKAR, 2009).

Os marcadores moleculares agregam muitas informações importantes, como quantificação da variabilidade genética, acompanhamento de migração dos indivíduos, avaliação da endogamia e distinção de novas espécies. Para o estudo da variabilidade genética são empregados marcadores de natureza codominante, como: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), microssatélites e aloenzimas, ou dominante, tais como: *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) (FREELAND, 2005).

Os marcadores dominantes são geralmente empregados por usarem iniciadores inespecíficos, os quais amplificam fragmentos de DNA através da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), sem o conhecimento prévio da sequência genômica, diminuindo trabalho e custo no desenvolvimento do iniciador. Esses marcadores revelam apenas um alelo em um dado *loci*, não podendo, assim, diferenciar um indivíduo homozigoto de um heterozigoto. É também conhecido como *multi-loci*, pois geram simultaneamente múltiplas bandas (*loci*) a partir de um único iniciador. Esses iniciadores produzem padrões de múltiplas bandas para cada indivíduo, reunindo no final dados suficientes para estudos de variabilidade genética (FREELAND, 2005).

Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) é um dos marcadores dominantes empregados para o estudo de variabilidade genética e os iniciadores utilizados são sequências repetitivas e orientadas em direções opostas de microssatélites gerando um padrão *multi-loci* com elevado grau de reprodutibilidade e de polimorfismo. Essa técnica apresenta ainda a vantagem de ser de fácil aplicação (GUPTA *et al.*, 1994; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; GODWIN; AITKEN; SMITH, 1997; BORNET; BRANCHARD, 2001).

Diversos marcadores foram utilizados em estudos de variabilidade genética com espécies do gênero *Salvia*. Javan, Rahmani e Heidari (2012) empregaram os marcadores moleculares dominantes, RAPD e ISSR. Com *Salvia miltiorrhiza* foram utilizados os marcadores AFLP (WANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2009), CoRAP (WANG; ZHANG; LU, 2009), ISSR (SONG *et al.*, 2010; ZHANG; LI; WANG, 2013) e RAPD (GUO *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2011).

O estudo de variabilidade genética e a sua interpretação em relação à genética de populações, à filogenia, à evolução e suas diversas aplicações determinam processos de análise multivariada, levando em conta o tipo do marcador molecular (dominante ou codominante) e o objetivo do trabalho (AVISE, 1993). Dessa forma, foram aplicadas diversas análises tanto para a avaliação dos iniciadores como para a variação gênica e estrutura populacional.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A confecção das lâminas semipermanentes e permanentes e a realização dos testes microquímicos foram desenvolvidas no Laboratório de Botânica Estrutural, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A preparação e a visualização do material no microscópio eletrônico de varredura foram concretizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, no Centro de Microscopia Eletrônica (CME), situado na UFPR. A extração do DNA, as reações de PCR-ISSR para o estudo de variabilidade genética e o PCR para o sequenciamento de duas regiões plastidiais foram executados no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, no Departamento de Botânica, situado na UFPR.

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

A espécie analisada foi *Salvia lachnostachys* Benth., que ocorre nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo (Harley *et al.*, 2013).

Foram feitas consultas aos herbários virtuais disponíveis no INCT- Herbário Virtual da Flora e dos Fungos (<http://www.splink.org.br>), no re flora (<http://reflora.jbrj.gov.br/>) e no JBRJ (<http://www.jbrj.gov.br/jabot>). Nestes 19 herbários consultados, não há exemplares da espécie coletados nos Estados de Santa Catarina e São Paulo.

Para o Estado de São Paulo existem registros de apenas três exemplares coletados entre os anos de 1816-1833 e depositados no herbário de Paris (P), sendo duas coletas de Saint-Hilaire (C²1469 e C²1599ter) e uma de Gaudichaud (289) citados por Epling e Toledo (1943).

Para Santa Catarina (REIS *et al.*, 2011) foram encontrados cinco exemplares da espécie coletados por L.B.Smith e R.Klein entre 1954 e 1964, e estão depositados no herbário do Museu Nacional do Rio de Janeiro (R).

As coletas do material botânico, para o presente estudo, foram realizadas através de excursões a campo, aleatórias e planejadas de modo a incluir a distribuição da espécie nos planaltos de Curitiba (município de Curitiba) e Ponta

Grossa (municípios de Palmeira e São Luiz do Purunã) no Estado do Paraná (FIGURAS 5, 6; QUADRO 1).

Coletas para a confecção de exsiccatas e para as extrações de DNA foram realizadas nas três populações. As exsiccatas foram incorporadas ao acervo do herbário UPCB do Departamento de Botânica da UFPR.

Para as análises morfológicas e anatômicas foram coletadas amostras na população de Curitiba.

Um indivíduo de cada população foi empregado para o código de barras de DNA. A amostragem utilizada para o estudo de variabilidade genética segue o QUADRO 1.

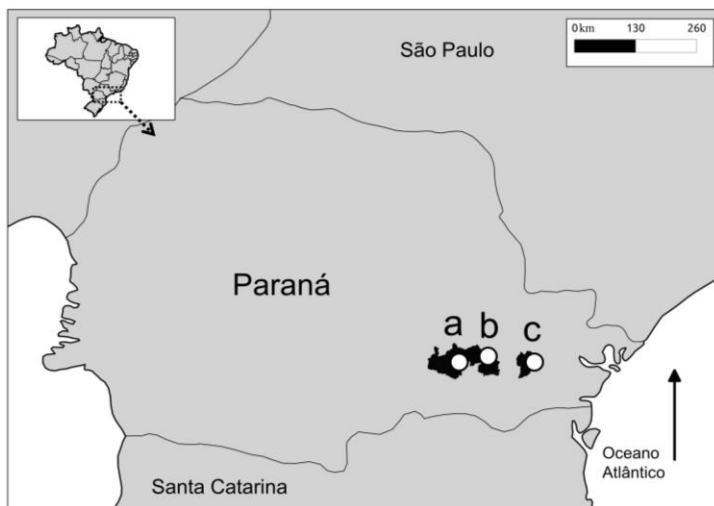


FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO DAS COLETAS DAS TRÊS POPULAÇÕES DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE) NO ESTADO DO PARANÁ (a = Palmeira; b = São Luiz do Purunã; c = Curitiba)

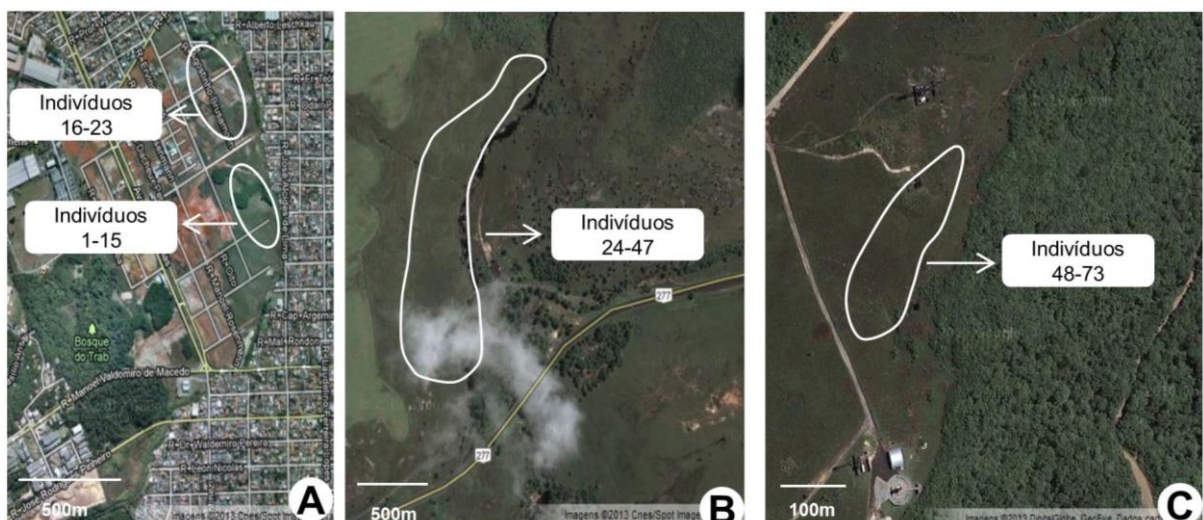


FIGURA 6 - ÁREA DE ESTUDO DAS TRÊS POPULAÇÕES DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE) NO ESTADO DO PARANÁ (a = Palmeira; b = São Luiz do Purunã; c = Curitiba)

Município	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Número de amostras	Número do voucher
a. Curitiba	S 25°30'22"	W 49°18'30"	932	23	E.P. Santos 1251
b. Palmeira	S 25°28'10"	W 49°48'05"	1.069	24	E.P. Santos 1264
c. São Luiz do Purunã	S 25°28'13"	W 49°39'33"	1.089	26	E.P. Santos 1266

QUADRO 1 - LOCALIZAÇÕES E AMOSTRAGEM DAS POPULAÇÕES DE *Salvia lachnostachys* COLETADAS NO ESTADO DO PARANÁ PARA O ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA

3.2 PREPARO DO MATERIAL

Para a análise morfoanatômica foram retiradas as folhas adultas e os fragmentos de caule entre 5–25 cm do ápice e fixados em FAA 70, sendo este composto de formol, ácido acético glacial e álcool etílico a 70%. O tempo mínimo para fixar as amostras foi de 18 horas. A fixação foi realizada para bloquear imediatamente o metabolismo das células, preservando-as (JOHANSEN, 1940). Para a preservação das folhas adultas e dos fragmentos de caule utilizou-se álcool etílico a 70% (BERLYN; MIKSCHE, 1976). Para a realização dos testes microquímicos foram empregados folhas adultas e fragmentos de caule frescos ou fixados no FAA.

Para a conservação do material genômico, uma pequena amostra da folha da planta foi retirada e acondicionada em solução saturada de NaCl/CTAB (35% NaCl, 3% CTAB) (ROGSTAD, 1992).

3.3 ESTUDO MORFOANATÔMICO

As dimensões da planta foram estabelecidas através da metragem (comprimento e largura) por meio de média simples. Para as dimensões das folhas, foi utilizado um paquímetro digital (CD-15CX, Mitutoyo®) e estas, foram constituídas por 30 indivíduos, presentes no Herbário UPCB, de diversos municípios do Estado do Paraná. A terminologia empregada para análise macroscópica seguiu Stearn (1983) e para a microscópica Metcalfe e Chalk (1950).

3.3.1 Preparo de Lâminas Semipermanentes

Foram realizados cortes, à mão livre, paradérmicos e transversais, com o auxílio de isopor como suporte (QUINTAS, 1963). Para a coloração desses cortes foram utilizados o azul de astra e a fucsina básica, para corar estruturas acidófilas e basófilas, respectivamente (ROESER, 1972). A montagem da lâmina, com intuito de preservar o material e unir a lâmina com a lamínula, foi feita com glicerina a 50% (BEÇAK; PAULETE, 1976; KRAUS; ARDUIN, 1997). E por fim, foi realizada a lutagem utilizando esmalte. Esse procedimento serve para retardar as modificações do material impedindo que o mesmo entre em contato com o ambiente (BEÇAK; PAULETE, 1976). Os cortes foram analisados e fotografados em aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x no microscópio fotônico (BX40, Olympus®).

3.3.2 Preparo de Lâminas Permanentes

As lâminas permanentes foram confeccionadas a partir do material fixado em FAA 70. A desidratação, que é um processo gradual e tem como finalidade a retirada de toda a água contida nos tecidos, foi realizada em série etanólica, colocando os cortes no álcool primeiramente a 80%, após 2 horas a 95% e em seguida, na pré-infiltração com álcool a 95% e resina a vácuo. Nessa fase de inclusão, a resina usada serve para facilitar a infiltração. O material foi infiltrado, por quatro dias, em glicol-metacrilato (Historesin, Leica®), emblocado e seccionado no micrótomo de rotação (CUT 4055, Olympus®), obtendo-se cortes extremamente finos. Ao final, os cortes foram corados com solução aquosa de azul de toluidina a 5% e montados em resina sintética diluída em tolueno da marca Permount® (BEÇAK; PAULETE, 1976; KRAUS; ARDUIN, 1997). Esses cortes foram analisados e fotografados no microscópio fotônico nos aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x (BX40, Olympus®).

3.3.3 Testes Microquímicos

Para os testes microquímicos foram utilizados cinco indivíduos e retirados caules e folhas adultos que estavam fixados em FAA, exceto para os testes de terpenoides com grupo carbonila que foram usados materiais frescos. Foram realizados cortes transversais à mão livre, na porção mediana, selecionados os melhores cortes, aplicados os reagentes de acordo com cada teste (QUADRO 2), lavados em água destilada e montados na lâmina com glicerina a 50%. Em seguida, os resultados foram observados e fotografados em microscópio fotônico nos aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x (BX40, Olympus®).

Grupo de Metabólitos	Reagente	Tempo de reação	Resultado positivo
A. Amido	Lugol (BERLYN; MIKSCH, 1976)	5 minutos	Azul negro ou marrom escuro
B. Compostos Fenólicos Totais	FeCl ₃ (JOHANSEN, 1940)	10 minutos	Negro azulado ou verde escuro
C. Lignina	Floroglucina (FOSTER, 1949)	5 minutos	Vermelho
D. Lipídeos Totais	Sudan III (SASS, 1951)	10-20 minutos	Vermelho
E. Terpenoide com grupo carbonila	2,4-dinitrofenil-hidrazina (GANTER; JOLLÉS, 1969-70)	10 minutos	Vermelho ou alaranjado

QUADRO 2 - TESTES MICROQUÍMICOS EMPREGADOS NOS CORTES DO CAULE E DA FOLHA DE *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise ultraestrutural de superfície em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi empregada segundo Souza (2007). As amostras (partes aéreas vegetativas da planta) acondicionadas em FAA 70 sofreram uma desidratação etanólica crescente (80%, 90% e 100%), sendo transferidas a cada 15 minutos. Essas amostras foram inseridas em uma câmara preenchida com álcool absoluto e colocadas no aparelho de ponto crítico (CPD-030, Balt-Tec®). Nessa fase, ocorreu a substituição até a remoção completa de álcool etílico por CO₂ para que o material

ficasse completamente seco. O material, após ponto crítico, foi aderido com uma fita de cobre a um suporte do MEV e metalizado com ouro no aparelho SCD-030, Balzers®. Essa etapa tem como finalidade o aumento da condutividade da superfície da amostra devido à presença da fina camada de metal que através de bombeamento de íons pesados de argônio, os átomos de ouro se depositam sobre todas as reentrâncias e proeminências da superfície da amostra. A última etapa foi a observação e a análise no microscópio eletrônico de varredura (JSM 6360LV, JEOL®) que produz imagens tridimensionais.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Para os estudos genéticos com *Salvia lachnostachys* foi extraído o DNA total de 73 indivíduos coletados nas três populações. Esse DNA foi empregado tanto para o sequenciamento das duas regiões plastidiais (um indivíduo de cada população) quanto para os estudos populacionais (QUADRO 1).

3.4.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada conforme o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1987) adaptado para tubos Eppendorf®. Foram pesados 100 mg de folhas que estavam acondicionadas na solução saturada de NaCl/CTAB (gel de CTAB), lavadas em água destilada, maceradas em um cadinho com 1 mL de STE (8,55 g sacarose; 1 M Tris; 0,5 M EDTA) gelado. O material foi transferido para microtubos onde foram adicionados 800 µL do tampão de extração CTAB 2X (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,5 M EDTA pH 8,0; 1,0 M Tris HCl pH 8,0; 2,0% PVP - polivinilpirrolidona) e colocados em banho-maria a 65°C por 45 minutos. Em seguida, foram acrescentados 800 µL de CIA (clorofórmio; álcool isoamílico 24:1 v/v) e os microtubos foram colocados no agitador durante 1 hora a 60 rpm (raio de 1,5 mm). Em seguida, foram centrifugados a 13.000 rpm (raio 9,5 cm) por 10 minutos a 10°C, o sobrenadante de cada amostra foi recuperado, transferido para microtubos onde foram acrescentados 650 µL de tampão de extração CTAB e ficaram por 20 minutos

na temperatura ambiente, após foi adicionado 650 µL de CIA e os microtubos foram transferidos para o agitador por 30 minutos a 60 rpm (raio de 1,5 mm) e logo após, foram centrifugados a 13.000 rpm (raio 9,5 cm) por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante de cada amostra foi recuperado e transferido para microtubos onde foram acrescentados 800 µL de CIA e transferidos para o agitador por 20 minutos a 60 rpm, centrifugados a 13.000 rpm (raio de 9,5 cm) por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi recuperado e adicionou-se 800 µL de isopropanol (PA) gelado e foram acondicionados no freezer por, no mínimo, 12 horas.

Depois, iniciou-se o processo de purificação do DNA através de sucessivas centrifugações. As duas primeiras centrifugações (8.000 rpm - 9,5 cm de raio - por 5 minutos a 4°C) foram feitas com álcool etílico a 70% gelado e a última, com álcool absoluto. Esses procedimentos foram realizados em centrífuga refrigerada. Após a purificação, o DNA presente no *pellet* permaneceu 12 horas em um recipiente protegido para sua secagem, posteriormente foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE (1,0 M Tris Base HCl pH 8,0; 0,5 M EDTA pH 8,0) durante 48 horas e transferido para o freezer à -20°C até o momento do seu uso.

Para a verificação da integridade do DNA foi feita a análise qualitativa por cuba de eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 1X (1,0 M Tris Base HCl pH 8,0; ácido bórico; 0,5 M EDTA pH 8,0) e 2,7 µL de brometo de etídio a 4%. O DNA total juntamente com o tampão de carregamento 1X (sacarose; azul de bromofenol 1:160 p/p) foram colocados nos poços do gel de agarose e a migração eletroforética ocorreu sob voltagem de 60 V por 30 minutos. O DNA foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta de 302 nm (2UV Transilluminator, Multi Doc®) e fotodocumentado.

O DNA empregado para o sequenciamento das regiões *matK* e *rbcL*, além de ter sido purificado com álcool como citado anteriormente, foi também purificado e concentrado, antes e após a amplificação, em coluna do kit de purificação de PCR (Qiagen® - QIAquick), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.4.2 Código de Barras de DNA

Para a descrição do código de barras de DNA foi feita a amplificação das duas regiões plastidiais, através da técnica de PCR. Em seguida, foi realizada as

reações de sequenciamento para as regiões *matK* e *rbcL* e as sequências foram analisadas no *software* Staden.

3.4.2.1 Amplificação das Regiões *matK* e *rbcL*

As amplificações foram realizadas em duas regiões plastidiais do DNA, que são *matK* e *rbcL* (QUADRO 3). Essas regiões estão de acordo com as recomendações do *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL): *Working Plant Group* (2009) para elaboração do código de barras de DNA das plantas terrestres. Os pares de iniciadores usados para amplificar a região *matK* foram propostos por Dunning e Savolainen (2010), e para a região *rbcL*, foram recomendados pelo CBOL por Kress e Erickson (2007) e Fay, Swensen e Chase (1997).

Regiões codificadoras	Iniciadores	Sequência dos iniciadores (5'→3')	Referência bibliográfica
<i>matK</i>	LAM-F	TCA TAA TTT ACG ATC AAT YC	DUNNING; SAVOLAINEN, 2010
	LAM-R	GCA CAA GAA AGT CGA A	DUNNING; SAVOLAINEN, 2010
<i>rbcL</i>	<i>rbcLa_f</i>	ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC	KRESS; ERICKSON, 2007
	724R	TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC	FAY; SWENSEN; CHASE, 1997

QUADRO 3 - REGIÕES CODIFICADORAS PARA O SEQUENCIAMENTO E SUAS RESPECTIVAS SEQUÊNCIAS DE INICIADORES UTILIZADOS PARA *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE. (Y = C ou T)

As amplificações para as regiões *matK* e *rbcL* foram realizadas no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf®) em um volume total de 40 µL. Os reagentes empregados na reação de PCR para a região *matK* seguem o QUADRO 4. Para a amplificação do gene *rbcL*, seguem as especificações no QUADRO 4, com as seguintes diferenças: ausência de DMSO e as concentrações de MgCl₂ (2,5 mM), dos iniciadores (0,5 pMol/µL) e da Taq polimerase (1 U).

As condições da reação no termociclador para o gene *matK* foram: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 46°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. E as condições da reação no termociclador para o *rbcL* foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos

de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Região codificadora	Reagentes	Concentração final	Uso
<i>matK</i>	Buffer	1X	Mantém o pH da reação.
	DMSO	4%	Substância estabilizante.
	Dntp	0,2 mM	Bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina e timina) que formam a cadeia complementar do DNA amplificado.
	BSA	0,1 mg/mL	Proteína estabilizante.
	MgCl ₂	1,5 mM	Cofator da TaqPolimerase.
	Iniciador <i>Forward</i>	1 pMol/μL	Oligonucleotídeo que inicia a formação da dupla fita de DNA.
	Iniciador <i>Reverse</i>	1 pMol/μL	Oligonucleotídeo que inicia a formação da dupla fita de DNA.
	Taq polimerase	2 U	Enzima que polimeriza a dupla fita de DNA recém-formada.
	H ₂ O milliQ	-	Solvente da reação.

QUADRO 4 - RELAÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) DA REGIÃO *matK* PARA *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE
 FONTE: Ford *et al.*, 2009

Os fragmentos amplificados foram purificados em coluna QIAquick da Qiagen® de acordo com as recomendações do fabricante. A verificação da presença do produto de DNA foi feita pela análise qualitativa por cuba de eletroforese em gel de agarose a 1%, tampão TBE 1X e tampão de carregamento 1X. As condições da migração eletroforética foram voltagem de 60V por 30 minutos. O material foi visualizado no transiluminador de luz ultravioleta de 302 nm e fotodocumentado e, para a análise quantitativa, foi utilizado o espectrofotômetro (BioPhotometer Plus, Eppendorf®).

3.4.2.2 Reação de Sequenciamento

Foram realizadas duas reações de sequenciamento no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf®), *forward* e *reverse*, contendo fragmentos amplificados de DNA com volume igual a 3,0 μL (40-50 ng de concentração inicial) e um conjunto de reagentes de volume igual a 7,0 μL (QUADRO 5), totalizando um

volume final de 10 μ L.

As condições utilizadas para a reação de sequenciamento foram: desnaturação inicial a 96°C por um minuto, 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 46°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos.

Reagentes	Concentração final	Volume utilizado	Função
Iniciador (<i>forward</i> e <i>reverse</i>)	5,0 pMol/ μ L	0,5 μ L	Oligonucleotídeo que inicia a formação da dupla fita de DNA.
Buffer	5X	3,0 μ L	Mantém o pH da reação.
BigDye®	-	1,0 μ L	Reativo para a reação de sequenciamento.
H ₂ O milliQ	-	2,5 μ L	Solvente da reação.

QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES PRESENTES NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PARA O ESTUDO DO CÓDIGO DE BARRAS DE DNA COM *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE

FONTE: Protocolo do BigDye® Terminator Sequencing Kit

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados com acetato de amônio 7,5 M (acetato de amônio; álcool etílico absoluto 2:60 v/v). Foram centrifugados por 45 minutos a 13.000 rpm e, em seguida, retirado o sobrenadante por inversão dos tubos, adicionados 100 μ L de álcool a 70° e centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm (9,5 cm de raio). O material centrifugado foi invertido novamente para a retirada de qualquer resquício de álcool e mantido com os frascos abertos, protegidos da luz, por 12 horas para total secagem.

As amostras foram ressuspensas em 10 μ L de formamida e inseridas no gelo por 15 minutos. Após a ressuspensão do material, as mesmas foram avaliadas em sequenciador automático com eletroferese capilar Genetic Analyzer 3500xL Applied Biosystems®.

3.4.2.3 Análise de Dados

As duas sequências (*forward* e *reverse*) e os eletroferogramas foram visualizados e conferidos no *software* Staden Package (STADEN, 1996). As sequências foram pré-processadas no Pregap4, utilizando os seguintes parâmetros: correspondência exata de no mínimo 15%, número máximo de blocos 70% e

porcentagem máxima de incompatibilidade 60%. Em seguida, no Gap4, as sequências foram editadas, baseando-se no índice de confiabilidade entre 20–45 e na intensidade de leitura acima ou igual a 100 para a escolha da base mais provável.

Após a obtenção da sequência consenso, unificado em uma única sequência após a junção das duas sequências depositadas no *software* Staden Package (*forward* e *reverse*), a mesma foi submetida para avaliação e verificação das similaridades com outras espécies de plantas nas bases de dados genômicas: BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL, 1990), ferramenta do banco de dados *GenBank* e BOLD Systems - *Barcode of Life Database* (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). Após a averiguação com as ferramentas BLAST e no BOLD, as sequências das regiões *matK* e *rbcL*, preconizadas pelo grupo CBOL (2009), foram depositadas no *GenBank* as quais esperam liberação.

3.4.3 Variabilidade Genética

Para o estudo de variabilidade genética foi realizada a amplificação do DNA através da técnica de PCR com o marcador ISSR empregando-se nove iniciadores. Os fragmentos amplificados foram analisados, permitindo a elaboração de uma matriz binária que foi empregada para as análises estatísticas.

3.4.3.1 Amplificação do DNA pela Técnica de PCR-ISSR

A amplificação das regiões do DNA é baseada na reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando como marcador o *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). A reação de ISSR foi preparada para um volume final de 20 µL, sendo 19 µL de reagentes (QUADRO 6) e 1 µL de DNA (concentração final de 1-2 ng/ µL). Essa combinação foi então colocada no termociclador, no qual ocorreu a formação dos fragmentos de DNA de acordo com o iniciador escolhido.

As amplificações foram realizadas empregando-se nove iniciadores, os quais foram utilizados com sucesso em diversos trabalhos envolvendo espécies de diferentes gêneros da família Lamiaceae (QUADRO 7).

Reagente	Concentração final	Função
Buffer	1X	Mantém o pH da reação.
DMSO	2%	Substância estabilizante.
dNTP	0,2 mM	Bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina e timina) que formam a cadeia complementar do DNA amplificado.
MgCl ₂	1,5 mM	Cofator da TaqPolimerase.
Taq polimerase	1,0 U	Enzima que acrescenta os nucleotídeos na cadeia de DNA recém-formada.
Iniciador (<i>primer</i>)	0,6 µM	Oligonucleotídeo que inicia a formação da dupla fita de DNA.
Água MilliQ	q.s.p.	Veículo da reação.

QUADRO 6 - COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES PRESENTES NA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) PARA O ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA COM *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE

Iniciador	Composição	Temperatura de anelamento	Referência*
(AC) ₈ T	ACACACACACACACT	51,4°C	AGOSTINI <i>et al.</i> , 2008
(AG) ₈ A	AGAGAGAGAGAGAGA	46,7°C	FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006; AGOSTINI <i>et al.</i> , 2008
(AG) ₈ C	AGAGAGAGAGAGAGC	48,8°C	RAHIMMALEK <i>et al.</i> , 2009
(AG) ₈ YC	AGAGAGAGAGAGAGYC	50,2°C	AGOSTINI <i>et al.</i> , 2008
(AG) ₈ YT	AGAGAGAGAGAGAGYT	49,2°C	FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006; RAHIMMALEK <i>et al.</i> , 2009
(CA) ₈ G	CACACACACACACAG	51,0°C	FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006; AGOSTINI <i>et al.</i> , 2008; RAHIMMALEK <i>et al.</i> , 2009
(CT) ₈ A	CTCTCTCTCTCTCTA	44,7°C	FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006
(CTC) ₄ RC	CTCCTCCTCCTCRC	51,7°C	FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006; AGOSTINI <i>et al.</i> , 2008
(GA) ₈ T	GAGAGAGAGAGAGAT	45,4°C	FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006; AGOSTINI <i>et al.</i> , 2008; RAHIMMALEK <i>et al.</i> , 2009

QUADRO 7 - RELAÇÃO DOS INICIADORES (*PRIMERS*) UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) PARA O MARCADOR ISSR NO ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA COM *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE. (Y = C ou T; R = A ou G)

* Estas referências são de trabalhos que aplicaram estes iniciadores com espécies de Lamiaceae.

No termociclador, as condições para a realização da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento com temperaturas variáveis conforme o iniciador

(QUADRO 7) por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para a visualização desses fragmentos foi empregada a técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose (1,5%) com TAE 1X (1,0 M Tris base pH 8,0; ácido acético glacial; 0,5 M EDTA pH 8,0) e 2,7 µL de brometo de etídio a 4%. O DNA amplificado e o tampão de carregamento 1X foram colocados no poço de gel de agarose. Foram inseridos também o marcador de peso molecular (K181, Amresco®) no primeiro e último poço do gel. As condições de migração foram voltagem de 80 V por 2 horas. Após a eletroforese, o DNA foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta de 365 nm e fotodocumentado.

3.4.3.2 Análise de Dados

Os dados provenientes do ISSR são dominantes, ou seja, cada banda representa o fenótipo de um único *locus* bialélico. Partindo dos produtos amplificados, todos os arquivos fotográficos de eletroforese foram analisados eletronicamente no *software* GelAnalyzer (LAZAR; LAZAR, 2010). A homologia entre as bandas observadas foi inferida baseada no tamanho médio dos fragmentos de DNA com uma margem de erro de 2%. Com base neste critério, foram construídas matrizes binárias codificadas em presença ou ausência de fragmentos. O padrão fenotípico dos 73 indivíduos para todos os iniciadores foi codificado em uma única matriz. Estes dados constituíram os elementos de entrada para o cálculo das variáveis através dos programas descritos no QUADRO 8.

Para definir a quantidade de marcadores necessários para um determinado nível de precisão na estimativa das distâncias genéticas, foram empregados os valores de variância de amostragem (TIVANG; NIENHUIS; SMITH, 1994; MANLY, 1997). O procedimento foi realizado no *software* GENES versão 2009.7.0 (CRUZ, 2006), empregando a distância genética calculada com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979) e considerando 1–159 marcadores. O número ideal de bandas polimórficas foi ponderado com base no valor de estresse < 0,05 como sugerido por Kruskal (1964).

Como não dispomos de nenhum dado prévio sobre sistema de cruzamento ou a frequência de cruzamentos aleatórios para o cálculo da frequência alélica

supomos o equilíbrio de Hardy-Weinberg. As estimativas de heterozigosidade foram estimadas nas leituras fenotípicas correspondentes aos alelos nulos (presença ou ausência de fragmentos de DNA). O índice de diversidade de Nei é uma estimativa da heterozigosidade esperada e não deve ser comparada diretamente com os dados dos marcadores que não sejam de mesma natureza. Estas estimativas de heterozigosidade permitem o cálculo de G_{ST} baseados na diversidade populacional e na diversidade total (Marette *et al.*, 2002).

Na estrutura populacional, estimada por meio do programa *Structure*, foram realizadas cinco corridas, testando $K = 1-10$, assumindo o modelo "admixture" e a correlação da frequência alélica. Para cada corrida, 50.000 réplicas da *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) foram realizadas após um período *burn-in* de 5.000 interações. A estatística empregada foi fundamentada na diferença de k (Δk), o qual se baseia na taxa de mudança no Ln entre sucessivos valores de k , definindo, assim, quais os números de populações mais prováveis (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005).

Estudos	Análises de variabilidade	Metodologia
Iniciadores	- Índice de Simpson	Fórmula: $S = \sum (1 - \sum f^2) / N$
	- Número de bandas polimórficas	Contagem
	- PPB: porcentagem de bandas polimórficas	Número de <i>loci</i> polimórficos em relação ao total de <i>loci</i>
Varição Gênica	- PPB: porcentagem de bandas polimórficas - Ao: número de alelos observados - Ae: número de alelos efetivos - He: diversidade gênica de Nei (NEI, 1973) - I: Índice de Shannon (SHANNON, 1948a, b)	PopGene versão 3.2 (YEH; YANG; BOULE, 1999)
Estrutura Genética das Populações	- AMOVA: análise da variância molecular intra e interpopulacional (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) - Nm: análise do nível de migração (McDERMOTT; McDONALD, 1993)	Arlequin versão 3.11 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005); GenAlEx versão 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006)
	- Construção do dendrograma por UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1972) - PCA: componente da análise principal	NTSYSpc (ROHLF, 2000); PAUP*4b10 (SWOFFORD, 2003)
	- K: valor modal da estrutura populacional (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005)	STRUCTURE versão 2.1 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000)

QUADRO 8 - ANÁLISES PARA O ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA COM MARCADORES ISSR DE *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO MORFOLÓGICO

Salvia lachnostachys Benth., Labiat. Gen. Sp. 267 (1833).

Erva perene, decumbente com ramos pubescente-glandulares, ascendentes, com enraizamento nos nós basais. Folhas simples, opostas e cruzadas, pecioladas (pecíolo 0,3–16 mm de comprimento); lâmina foliar (0,7–5,4 x 0,2–2,5 cm), estreitamente ovada, venação craspedódroma, superfície ondulada, margem crenada, base arredondada e ápice obtuso, superfície superior pubescente-glandular e a inferior tomentoso-glandular (FIGURA 7A). Inflorescência terminal (2,5–27 cm de comprimento), viloso-glandular, com 7–17 verticilastros; cada verticilastro com 8–14 flores, brácteas (5–8 x 4,5–7 mm) persistentes, sésseis, ovaladas, viloso-glandulares; pedicelos (0,1–0,6 mm de comprimento), viloso-glandulares (FIGURAS 7A, B). Cálice com 6–8 mm de comprimento na floração, 7–9 mm na frutificação, viloso-glandular; lábio superior 2,5–3 mm de comprimento, inteiro, obtuso, 7-nervado; lábio inferior 2–2,3 mm de comprimento, com dois dentes obtusos 1,7–2 mm de comprimento, 7-nervado (FIGURAS 7C, D, F). Corola azul, 9,5–13 mm de comprimento a partir da base para o ápice do lábio superior, da base ao lábio inferior 13,5–18 mm de comprimento, viloso-glandular. Corola tubo 6,5–9 mm de comprimento, lábio superior 3–4 mm de comprimento, falcado; lábio inferior 7–9 mm de comprimento, trilobado (FIGURAS 7C, E, G). Estames dois, anexados na porção mediana do tubo da corola, tecas férteis oblongas com cerca de 1,5 mm de comprimento, inclusas no lábio superior da corola; tecas estéreis c. 1 mm de comprimento; filete c. 1,5 mm de comprimento; conectivo c. 4,5 mm de comprimento (FIGURA 7G). Estaminódios dois, com 0,7–0,8 mm de comprimento (FIGURAS 7H, I). Estilete 9 mm de comprimento, viloso no terço superior; estigma bífido com o ramo anterior 2,5 mm de comprimento, ramo posterior 0,5 mm de comprimento (FIGURAS 7G, J). Núculas 3–4 mm de comprimento, oblongas (FIGURA 7F).

M.L.B.

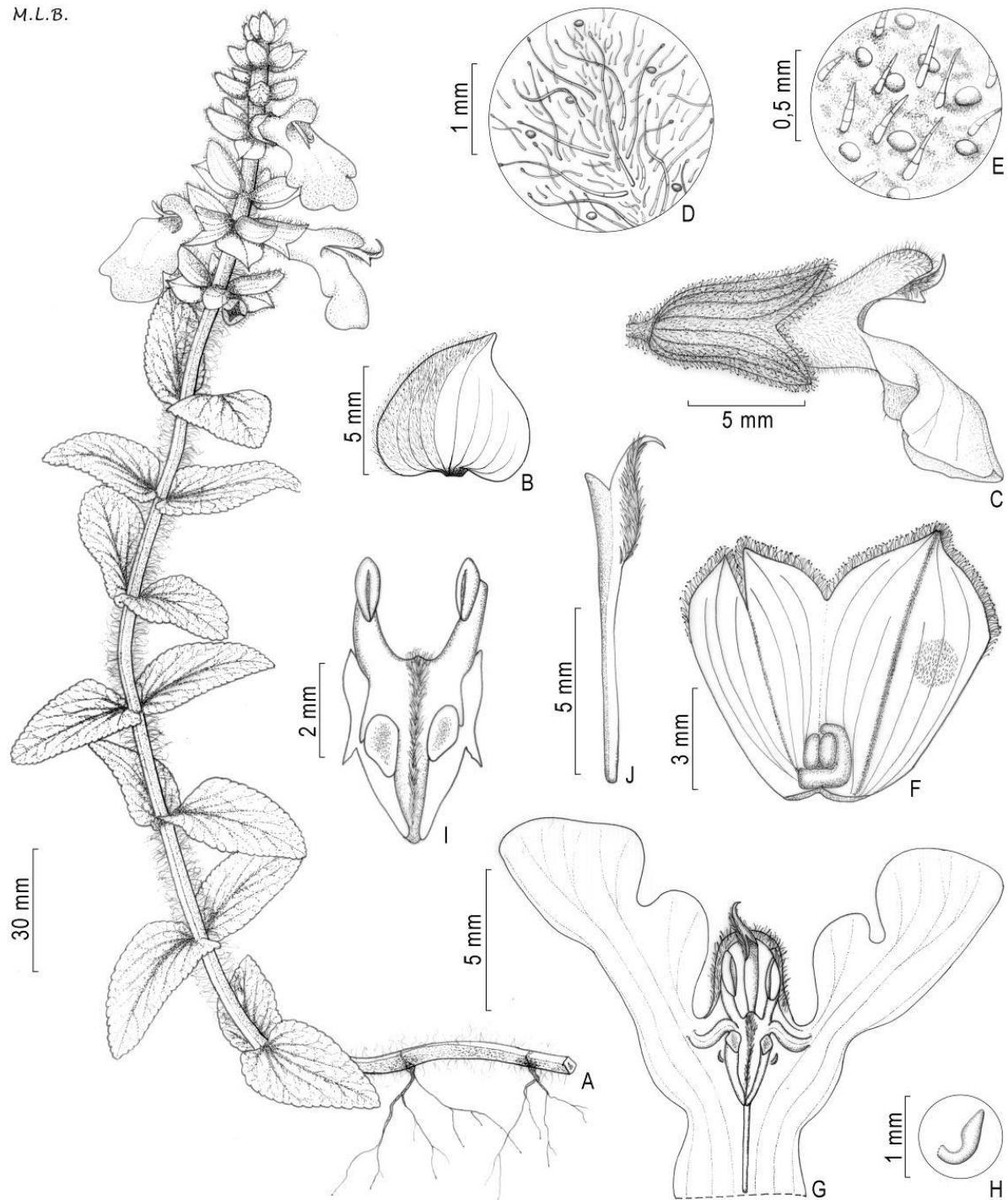


FIGURA 7 - *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE: A. HÁBITO; B. BRÁCTEA; C. FLOR EXIBINDO CÁLICE E COROLA BILABIADA; D. DETALHE DO INDUMENTO DO CÁLICE; E. DETALHE DO INDUMENTO DA COROLA; F. CÁLICE ABERTO MOSTRANDO O OVÁRIO E O NECTÁRIO; G. COROLA MOSTRANDO ESTAMES, ESTAMINÓDIOS, ESTILETE E ESTIGMA; H. ESTAMINÓDIOS; I. ESTAMES SEM FILAMENTOS; J. ESTILETE

Fonte: ERBANO *et al.*, 2012.

4.2 ESTUDO ANATÔMICO

4.2.1 Caule

O caule, em secção transversal, apresenta um formato quadrangular (FIGURA 8A). Foi observada a presença de tricomas tectores (FIGURAS 8C-E, H) e glandulares (FIGURAS 8B, F, H). Os tricomas tectores podem ser unicelulares (FIGURA 8C), 0,2–0,8 mm de comprimento, bicelulares (FIGURAS 8D, E), 0,6–1,5 mm de comprimento ou pluricelulares, 1,5–2,5 mm de comprimento, com até sete células (FIGURA 8H), todos unisseriados, de ápice agudo e cutícula ornamentada (FIGURA 8D) ou sem ornamentação. Os tricomas glandulares podem ser peltados (FIGURAS 8B, F) ou capitados (FIGURAS 8F, H). Os tricomas glandulares peltados, de 0,3–0,5 mm de comprimento (FIGURAS 8B, F), apresentam cutícula lisa, uma célula basal, um pedicelo curto e uma cabeça secretória globosa multicelular; os tricomas glandulares capitados, de 0,3–0,5 mm de comprimento, apresentam pedicelo curto unicelular e uma cabeça globosa (FIGURAS 8F, H) uni ou bicelular, ou de 0,9–1,5 mm de comprimento, com pedicelo longo com 2–4 células e uma cabeça globosa unicelular.

A epiderme é uniestratificada (FIGURAS 9A, B), com células poligonais, a cutícula é espessada e plissada (FIGURAS 8F, H; 9B). Na região cortical, há 2–6 camadas de células colenquimáticas do tipo anelar e 3–4 estratos parenquimáticos nos ângulos do caule (FIGURA 9A) e uma camada de colênquima do tipo anelar e 2–4 estratos de células parenquimáticas entre esses ângulos (FIGURA 9A). Envolvendo o sistema vascular, existem 2–3 estratos de bainha esclerenquimática descontínua presente principalmente nos ângulos (FIGURA 9C). O cilindro vascular, com floema externamente ao xilema, apresenta formato quadrangular (FIGURA 9A), sendo que o floema possui 6–7 camadas de células nos ângulos e 2–3 entre estes ângulos (FIGURAS 9A, D) e o xilema é percorrido por raios parenquimáticos estreitos (FIGURAS 9A, E), lignificado especialmente nos ângulos (FIGURA 8G). A medula é formada de células maiores se comparadas com as outras células do caule (FIGURA 9A).

4.2.2 Folha

O pecíolo, seccionado transversalmente, demonstra um contorno côncavo-convexo (FIGURA 10A). Foi observada a presença de tricomas tectores (FIGURA 10D) e glandulares (FIGURAS 10B-D). Os tricomas tectores podem ser unicelulares (FIGURA 10D), de 0,2–0,8 mm de comprimento, bicelulares, de 0,6–1,5 mm de comprimento ou pluricelulares com 3–6 células, de 1,5–2,5 mm de comprimento, todos os tricomas tectores são unisseriados, de ápice agudo e cutícula ornamentada. Os tricomas glandulares podem ser peltados (FIGURAS 10B, C) ou capitados (FIGURA 10D) ambos com cutícula lisa. Os tricomas peltados, com 0,3–0,5 mm de comprimento, apresentam um pedicelo curto e uma cabeça globosa multicelular (FIGURAS 10B, C); os tricomas capitados podem ter 0,3–0,5 mm de comprimento, pedicelo curto unicelular e uma cabeça globosa uni (FIGURA 10D) ou bicelular ou podem ter, 0,9–1,5 mm de comprimento, pedicelo longo unicelular, com uma célula pescoço ou pedicelo longo com 3–4 células, ambos com uma cabeça globosa unicelular.

A epiderme da face superior é uniestratificada com células retangulares a ovais, apresenta cutícula espessa e plissada (FIGURAS 10D, F). Logo abaixo à epiderme, há uma camada de colênquima, predominantemente do tipo anelar (FIGURA 10F), e nos ângulos passa a ter 3–4 camadas de parênquima (FIGURA 10A). Possui um feixe vascular colateral na região central e dois feixes menores nas laterais (FIGURA 10A). O feixe vascular apresenta uma calota esclerenquimática (FIGURAS 10A, G), de formato em arco aberto e encurvado nas extremidades. O floema apresenta 3–4 camadas de células e o xilema é percorrido por raios parenquimáticos (FIGURA 10G). Há 6–7 estratos de parênquima fundamental e 1–3 camadas de colênquima do tipo anelar-angular (FIGURAS 10A, F). A estrutura da epiderme da face inferior é semelhante à da face oposta.

A lâmina foliar, em vista frontal, possui uma epiderme levemente sinuosa (FIGURAS 11A, C), revestida por uma cutícula estriada nas duas superfícies (FIGURAS 11B, E, F, H). Foram observados tricomas tectores (FIGURAS 11B, D-F, I-K) e glandulares (FIGURAS 11B, D-H) em ambas as faces, sendo em maior quantidade na superfície abaxial. Na face adaxial, os tricomas tectores (FIGURA 11B) podem ser unicelulares, 0,2–0,8 mm de comprimento, bicelulares, 0,6–1,5 mm

de comprimento ou pluricelulares, 1,5–2,5 mm de comprimento, com até quatro células, todos unisseriados, de ponta aguda e cutícula levemente estriada. Os tricomas glandulares do tipo capitado (FIGURA 11B) possuem cutícula lisa e podem ter 0,3–0,5 mm de comprimento, pedicelo curto unicelular e uma cabeça globosa uni ou bicelular ou, pode ter 0,9–1,5 mm de comprimento, pedicelo longo com 3–4 células e uma cabeça globosa unicelular. Na face abaxial, além dos tricomas citados na superfície oposta, foram observados também tricomas glandulares do tipo capitado: com 0,3–0,5 mm de comprimento, pedicelo curto bicelular e cabeça globosa uni ou bicelular; e com 0,9–1,5 mm de comprimento, pedicelo longo uni ou bicelular (FIGURAS 11G, H), uma célula pescoço e uma cabeça globosa unicelular (FIGURA 11F), além do tipo peltado com 0,3–0,5 mm de comprimento, pedicelo curto e cabeça globosa multicelular (FIGURA 11E).

Os estômatos que apresentam cristas cuticulares externas evidentes são diacíticos e estão presentes nas duas superfícies, caracterizando a folha como anfiestomática (FIGURAS 11A, C).

Em secção transversal, a epiderme é uniestratificada com células maiores na face adaxial se comparadas com a face abaxial e apresenta uma cutícula levemente estriada (FIGURAS 12A, B). As células-guarda estão dispostas no mesmo nível das outras células epidérmicas (FIGURA 12B). O mesofilo é dorsiventral, apresentando 3–4 camadas de células paliádicas voltadas à face adaxial, e parênquima esponjoso multiestratificado na superfície oposta (FIGURA 12B). Ao longo do mesofilo, há feixes vasculares de médio porte do tipo colateral.

A nervura vascular central é côncavo-convexa com curvatura proeminente na face abaxial (FIGURA 12A). A epiderme da face superior é uniestratificada com cutícula plissada (FIGURAS 11B, 12C). São observadas 1–2 camadas de colênquima predominantemente anelar (FIGURAS 12C, D). O feixe vascular colateral possui uma calota esclerenquimática e está disposto em forma de arco aberto (FIGURAS 12A, E). O xilema apresenta os elementos traqueais dispostos em fileiras e que são separados por células parenquimáticas (FIGURA 12E). Há cinco camadas de parênquima fundamental, uma de colênquima predominantemente anelar e epiderme na face inferior uniestratificada com cutícula plissada (FIGURAS 11D-F, 12D).

4.2.3 Testes Microquímicos

Terpenoides com grupo carbonila foram observados nos tricomas tectores (FIGURA 8C) e glandulares peltados (FIGURA 10B) e capitados na região da cabeça globosa do caule e da folha. Foram observados também terpenoides nas células epidérmicas do limbo foliar (FIGURA 12F).

Compostos fenólicos foram observados nos tricomas glandulares capitados e peltados, nas células da epiderme e no parênquima fundamental do caule (FIGURA 8I) e da folha, e no parênquima paliçádico da folha.

A presença de lignina foi confirmada apenas na bainha esclerenquimática e no xilema do caule (FIGURA 8G) e na calota esclerenquimática e no xilema tanto da nervura central como do pecíolo (FIGURA 10E).

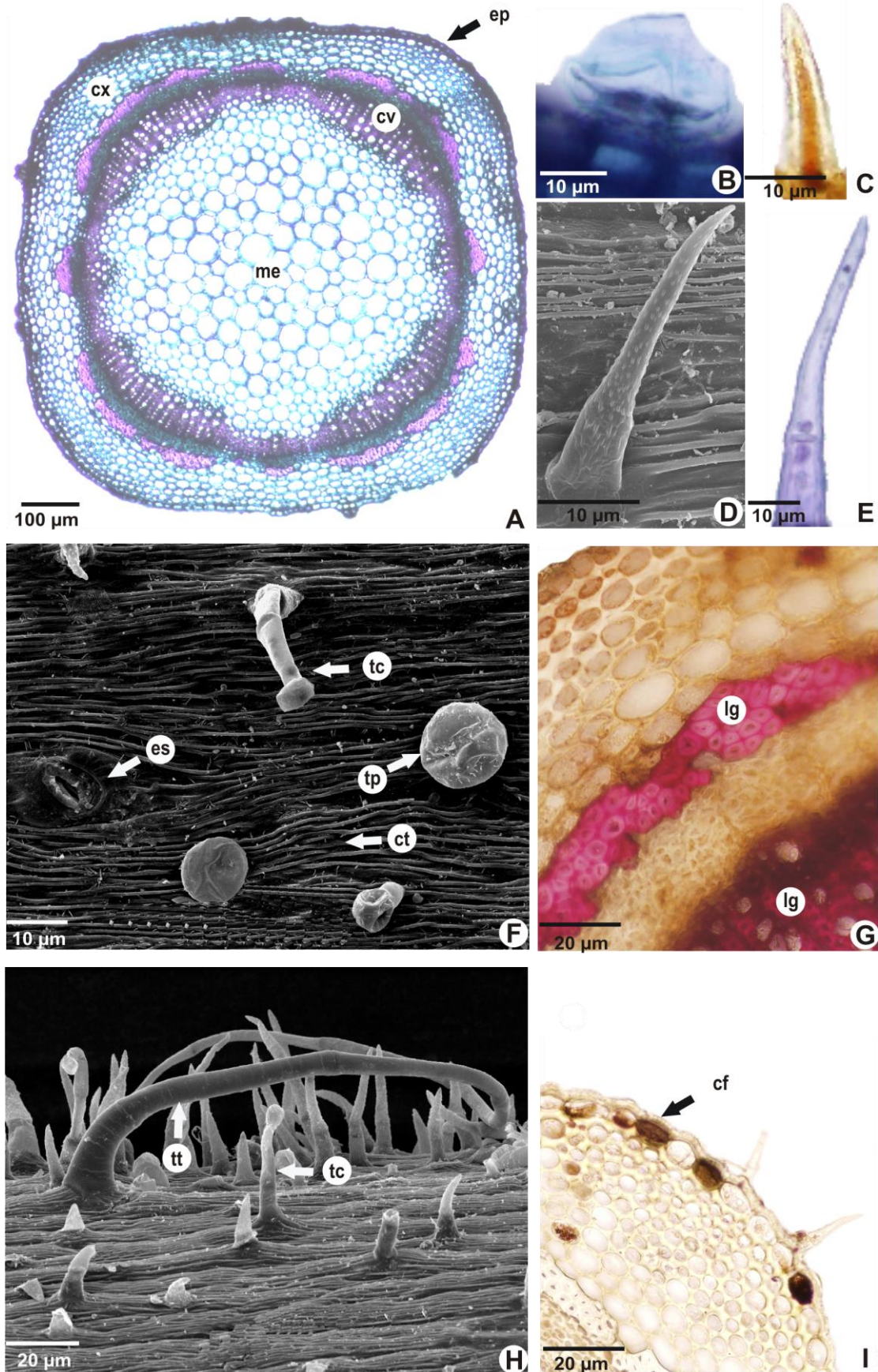


FIGURA 8 - *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE. CAULE: A. ASPECTO GERAL; B. TRICOMA GLANDULAR PELTADO; C-E. TRICOMAS TECTOES; F. CUTÍCULA PLISSADA, ESTÔMATO E TRICOMAS GLANDULARES; G. TESTE POSITIVO PARA LIGNINA; H. ASPECTO GERAL DA SUPERFÍCIE; I. TESTE POSITIVO PARA COMPOSTOS FENÓLICOS. ABREVIATURAS: cf - COMPOSTO FENÓLICO, ct - CUTÍCULA, cv - CILINDRO VASCULAR, cx - CÓRTEX, ep - EPIDERME, es - ESTÔMATO, lg - LIGNINA, me - MEDULA, tc - TRICOMA CAPITADO, tp - TRICOMA PELTADO, tt - TRICOMA TECTOR

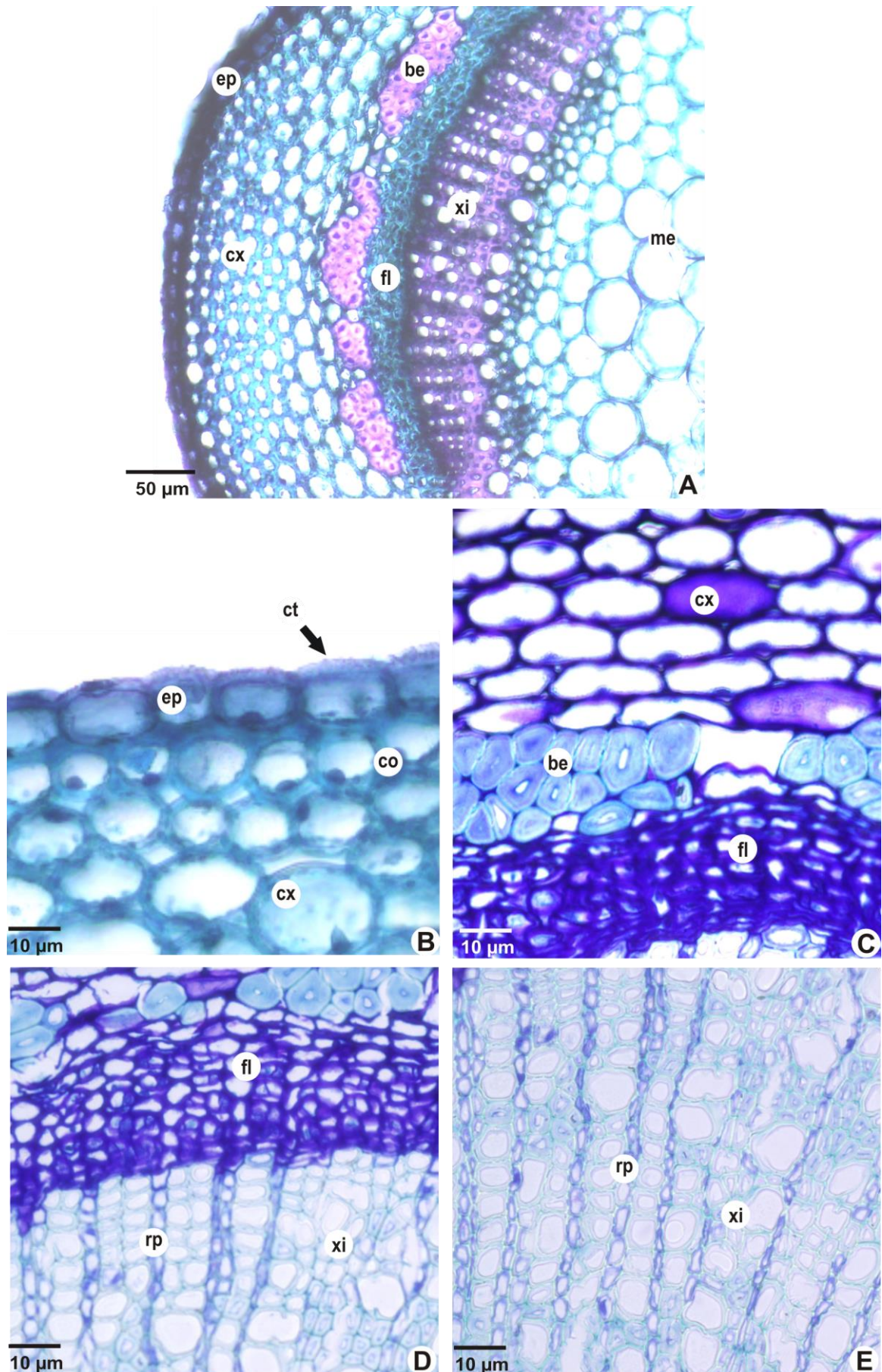


FIGURA 9 - *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE. CAULE: A. DETALHE DO CAULE; B. PORMENOR DA CUTÍCULA PLISSADA, EPIDERME E COLÊNQUIMA; C. CÔRTEX, BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA E FLOEMA; D. CILINDRO VASCULAR; E. DETALHE DO XILEMA. ABREVIATURAS: be - BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA, co - COLÊNQUIMA, ct - CUTÍCULA, cx - CÔRTEX, ep - EPIDERME, fl - FLOEMA, me - MEDULA, rp - RAIO PARENQUIMÁTICO, xi - XILEMA

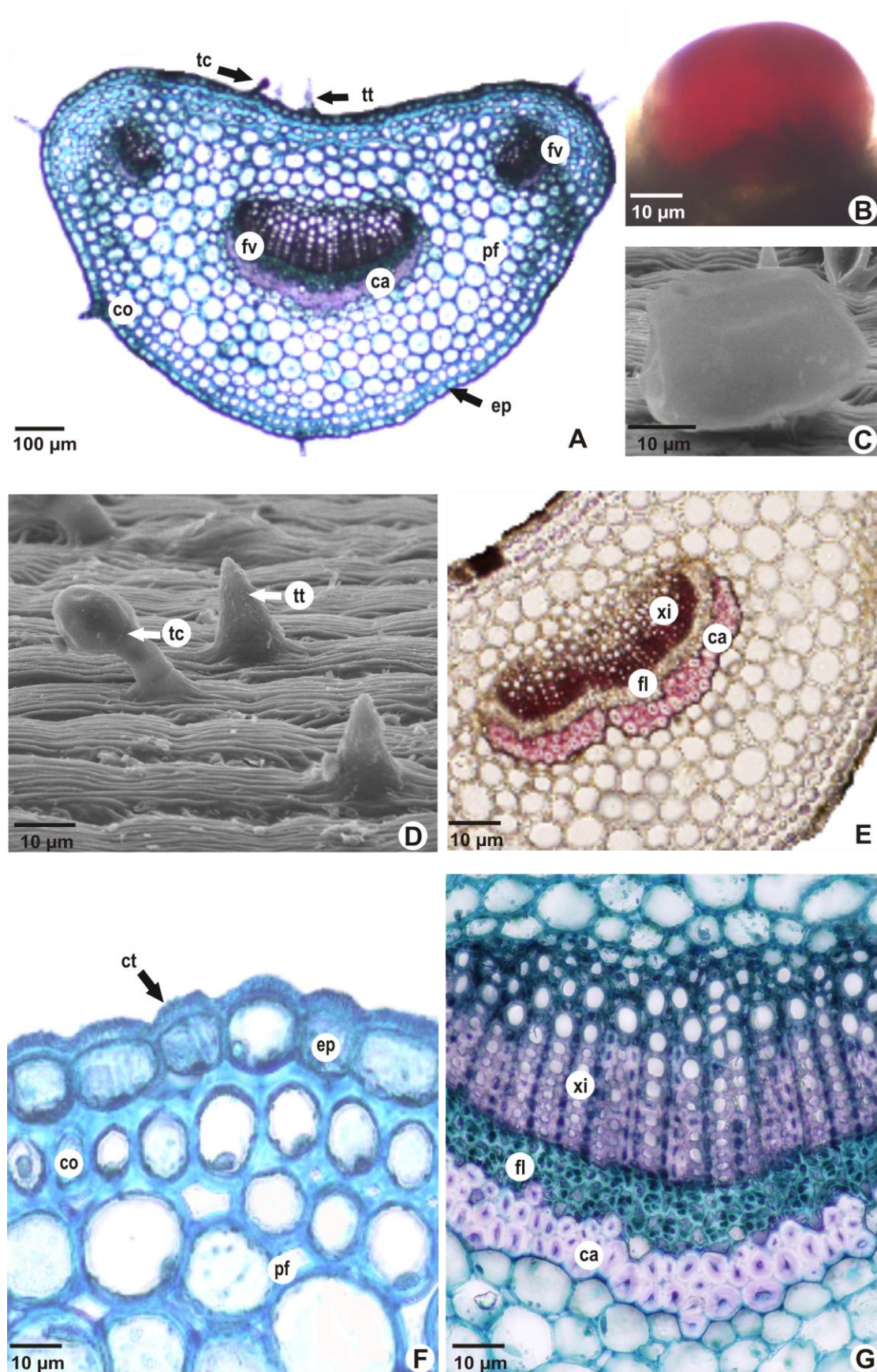


FIGURA 10 - *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE. PECÍOLO: A. ASPECTO GERAL; B. TESTE POSITIVO PARA TERPENOIDES; C. TRICOMA GLANDULAR PELTADO (MEV); D. TRICOMAS GLANDULAR CAPITADO E TECTORES (MEV); E. TESTE POSITIVO PARA LIGNINA; F. CUTÍCULA PLISSADA, EPIDERME E COLÊNQUIMA; G. SISTEMA VASCULAR. ABREVIATURAS: ca - CALOTA ESCLERENQUIMÁTICA, co - COLÊNQUIMA, ct - CUTÍCULA, ep - EPIDERME, fl - FLOEMA, fv - FEIXE VASCULAR, MEV - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, pf - PARÊNQUIMA FUNDAMENTAL, tc - TRICOMA CAPITADO, tt - TRICOMA TECTOR, xi - XILEMA

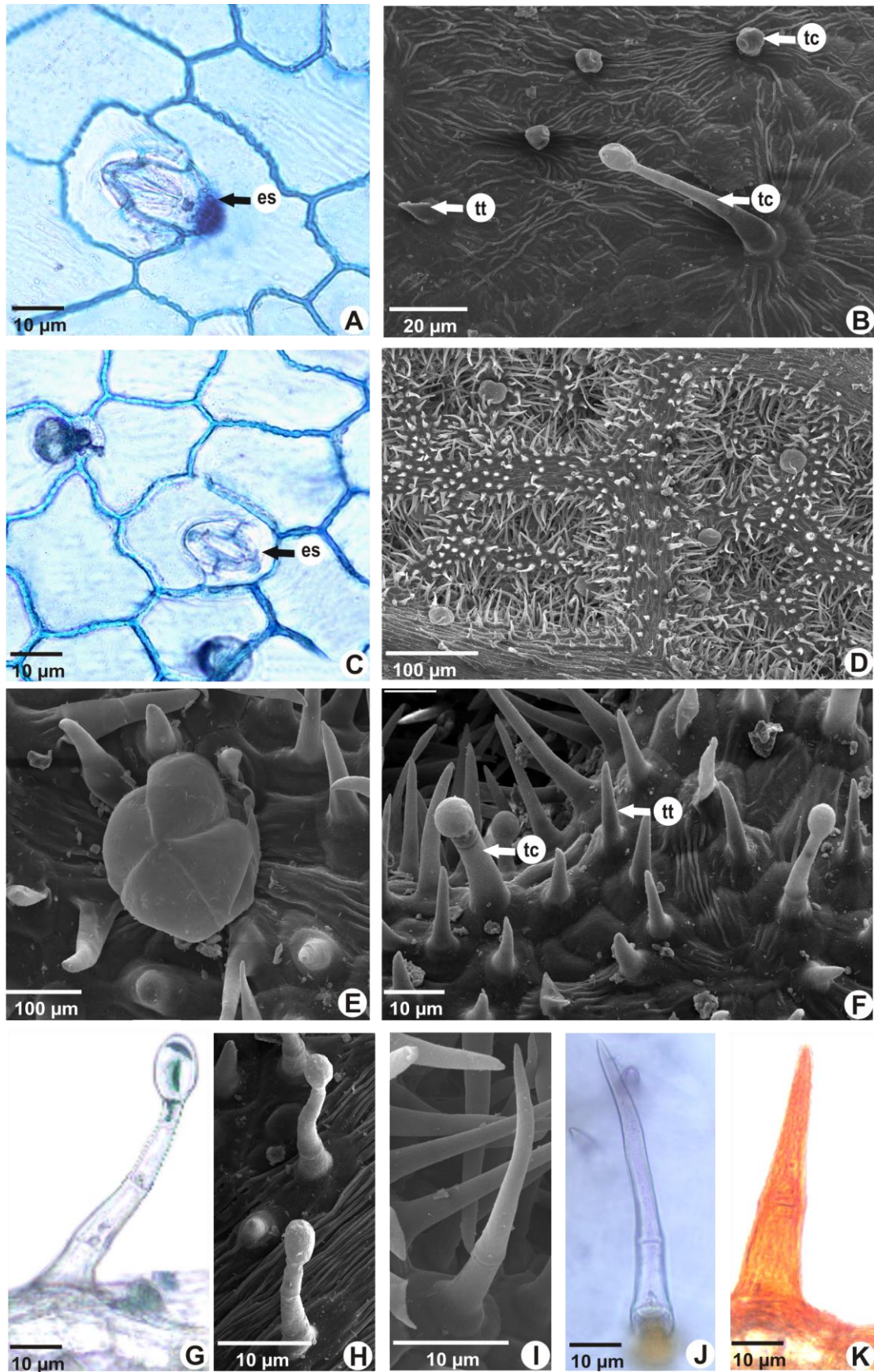


FIGURA 11 - *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE. FOLHA, VISTA FRONTAL DA EPIDERMIS: A. SUPERFÍCIE ADAXIAL; B. TRICOMAS DA FACE ADAXIAL (MEV); C. SUPERFÍCIE ABAXIAL; D. ASPECTO GERAL DOS TRICOMAS NA FACE ABAXIAL (MEV); E. TRICOMA GLANDULAR PELTADO (MEV); F. TRICOMAS GLANDULARES CAPITADOS E TECTORES UNISSERIADOS (MEV); G, H. TRICOMAS GLANDULARES CAPITADOS (H - MEV); I, J, K. TRICOMAS TECTORES (I - MEV). ABREVIATURAS: es - ESTÔMATO, MEV - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, tc - TRICOMA GLANDULAR CAPITADO, tp - TRICOMA GLANDULAR PELTADO, tt - TRICOMA TECTOR

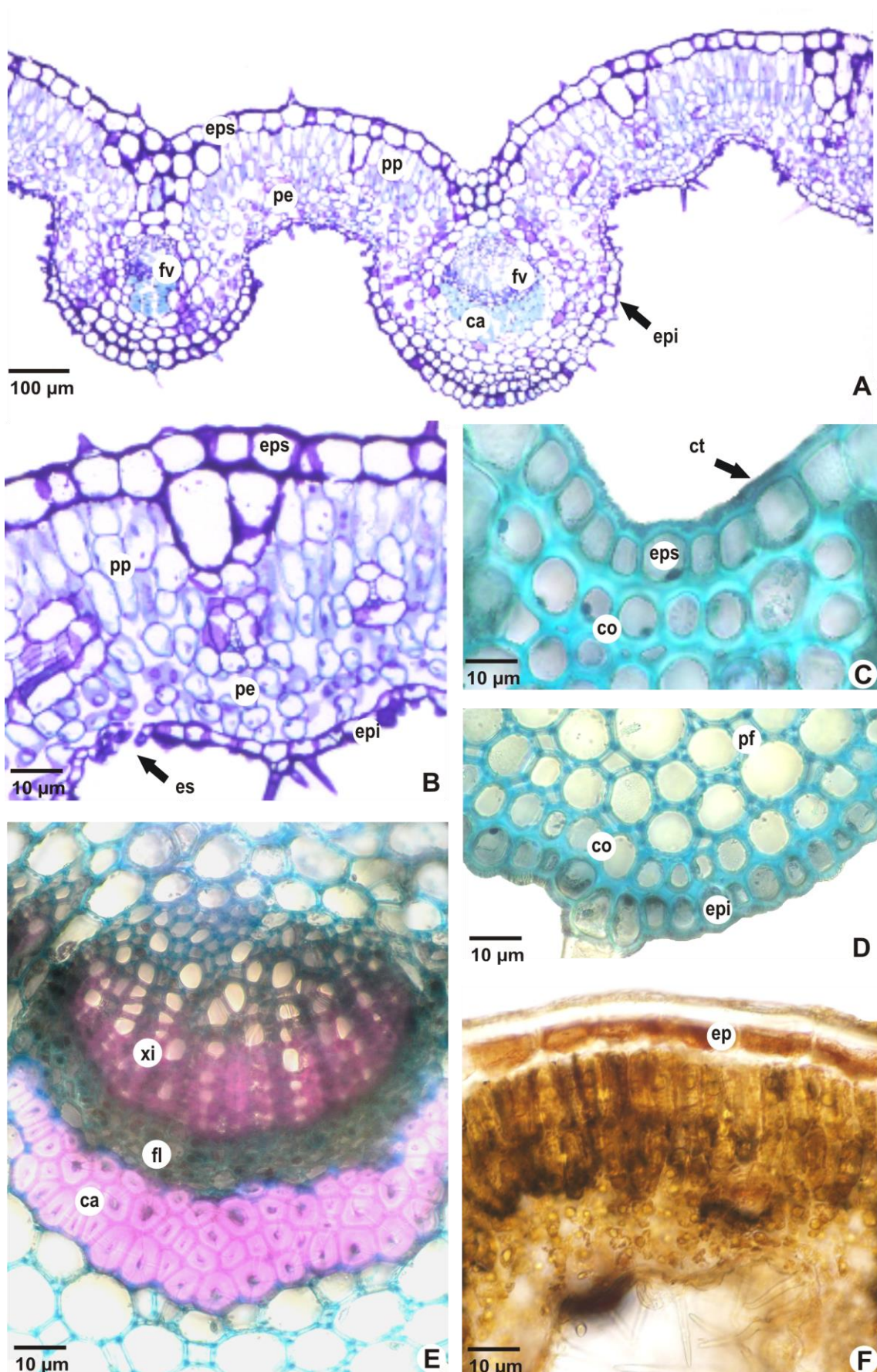


FIGURA 12 - *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE. FOLHA: A. ASPECTO GERAL; B. MESOFILO; C,D. DETALHE DA EPIDERME E DO COLÊNQUIMA; E. SISTEMA VASCULAR E CALOTA ESCLERENQUIMÁTICA; F. TESTE POSITIVO PARA TERPENÓIDES. ABREVIATURAS: ca - CALOTA ESCLERENQUIMÁTICA, co - COLÊNQUIMA, ct - CUTÍCULA, ep - EPIDERME, epi - EPIDERME NA FACE ABAXIAL, eps - EPIDERME NA FACE ADAXIAL, es - ESTÔMATO, fl - FLOEMA, fv - FEIXE VASCULAR, pe - PARÊNQUIMA ESPONJOSO, pf - PARÊNQUIMA FUNDAMENTAL, pp - PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, xi - XILEMA

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

4.3.1 Extração do DNA

As extrações de DNA dos 73 indivíduos de *Salvia lachnostachys* das populações de Curitiba, Palmeira e São Luiz do Purunã foram realizadas com sucesso, como demonstram as FIGURAS 13–15. Não foram visualizadas no gel de agarose os fragmentos de DNA das amostras 14 e 50, para essas foi feita uma nova extração.

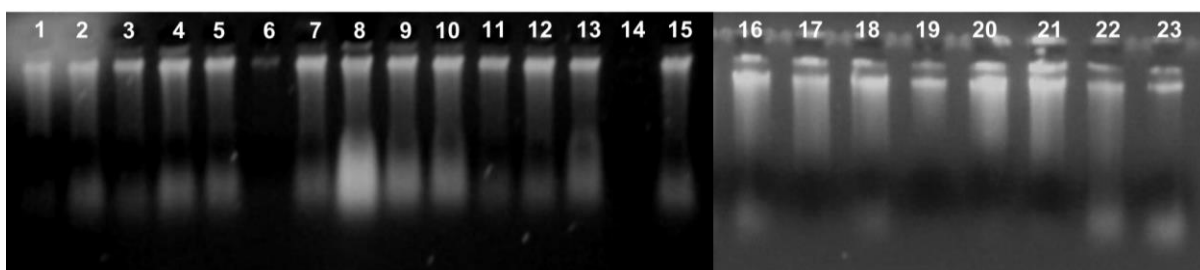


FIGURA 13 - GEL DE ELETROFORESE DE AMOSTRAS DE DNA GENÔMICO DE 23 INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO DE CURITIBA DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE)

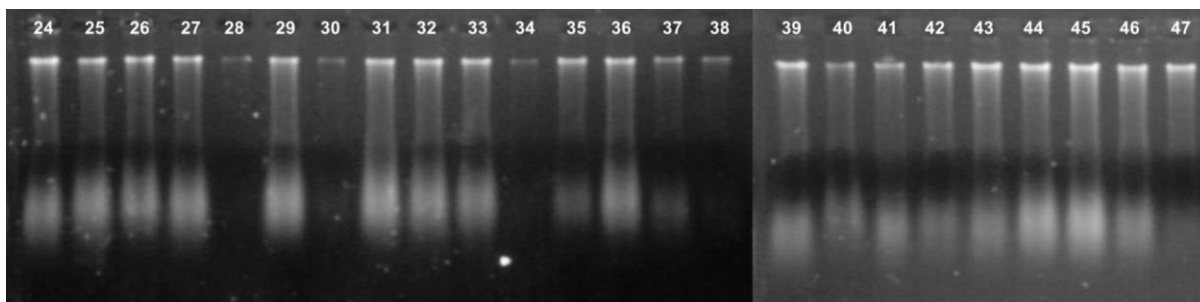


FIGURA 14 - GEL DE ELETROFORESE DE AMOSTRAS DE DNA GENÔMICO DE 24 INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO DE PALMEIRA DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE)

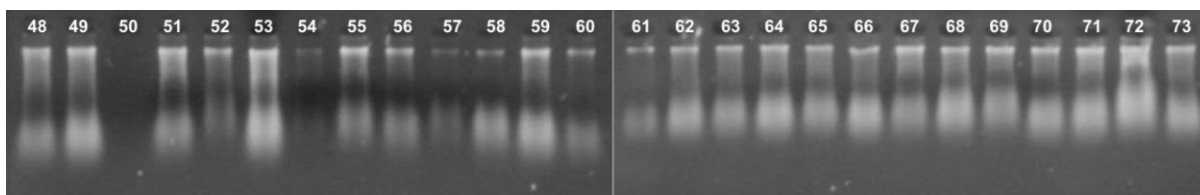


FIGURA 15 - GEL DE ELETROFORESE DE AMOSTRAS DE DNA GENÔMICO DE 26 INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO DE SÃO LUIZ DO PURUNÃ DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE)

4.3.2 Código de Barras de DNA

Os produtos da reação de PCR para as duas regiões codificadoras (*matK* e *rbcL*) foram amplificados com sucesso, utilizando um indivíduo de cada população (FIGURA 16).

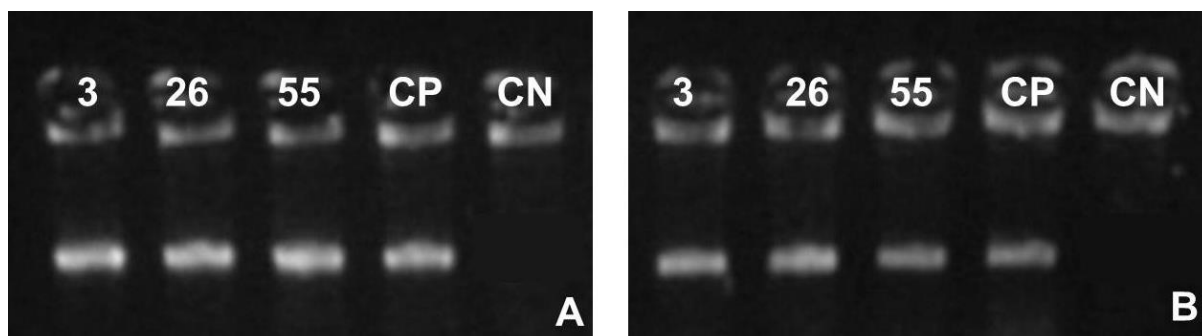


FIGURA 16 - PRODUTOS DA PCR DAS REGIÕES *matK* (A) e *rbcL* (B) DAS POPULAÇÕES DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE) (3 - INDIVÍDUO DE CURITIBA; 26 - INDIVÍDUO DE PALMEIRA; 55 - INDIVÍDUO DE SÃO LUIZ DO PURUNÃ; CP - CONTROLE POSITIVO; CN - CONTROLE NEGATIVO)

4.3.2.1 Sequenciamento da Região *matK*

O sequenciamento da região *matK* para os três indivíduos de *Salvia lachnostachys* resultaram em eletroferogramas com intensidade de leitura acima de 100 e índice de confiabilidade entre 18–45, como mostra o exemplo da FIGURA 17.

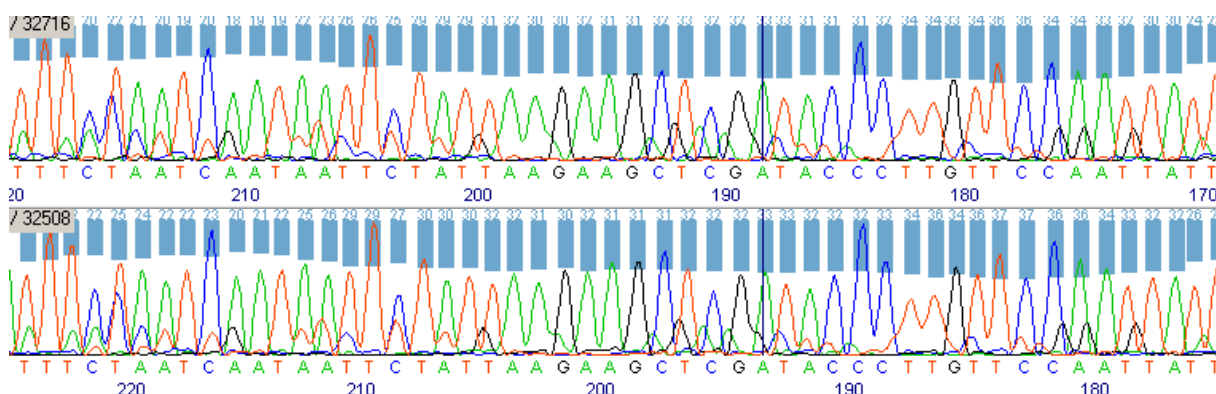


FIGURA 17 - TRECHO DO ELETROFEROGRAMA DA REGIÃO *matK* DA POPULAÇÃO DE PALMEIRA DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE). (AS BARRAS AZUIS SUPERIORES INDICAM O ÍNDICE DE CONFIABILIDADE; OS NÚMEROS EM AZUL ABAIXO DAS SEQUÊNCIAS INDICAM A QUANTIDADE DE BASES NITROGENADAS E OS PICOS EM CORES DIFERENTES INDICAM AS BASES NITROGENADAS)

Os indivíduos 15, 26 e 64, representados pelas populações de Curitiba (A), Palmeira (B) e São Luiz do Purunã (C), respectivamente, obtiveram para a região *matK* 807 pares de bases. Comparando entre esses três indivíduos, sendo um por população, houve divergências de pares de bases nas posições 29, 128, e 304, as quais estão destacadas em vermelho na FIGURA 18.

TTAGATATACTAATACCTCGCTCTGTCC	T	TGTGGAAATCTTGATTCAAACCTCTTCGCCATTGGGTAAAAGATGTTTCTTCTTTGCATTTAT	A
TACGAGTCTTTCTCAACGAATATTGGAATTGGAGTA	G	TCTTCTTACTCCTCAAGAAAGTAAGCTTCTCTTTTCAAAAAGAAATCAAAGGT	
TATTTTTTTTCTTATACAATCTCATGTATGTGAATACGAATCTATTTTCACCTTTCTACGTAAACAATCTCTTCATTACGATCAACGCTCT			
TTGGAGTCTTCTTGAAGAATCTATTTCT	T	ATATAAAAAATAAAAGGTCTTATGAACACCTTTGTTAATAATTTTCAGGCGAACCTAGGGTT	
GGTCGAGGAACCTGTCATGCATTATATTAGGTATCAAAGAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGGGACATCCCTTTTCATGAATAAATGGA			
AATTTTACCTTGTCACCTTTTGGCAATGGCATTTTTCGGTGTGGTTTCATCCAAGAAGTATTTTGATAAACCAATTTTCCAAGCATTCCCT			
TGCAATTTTGGGCTATCTTTCAAACGTGCAAATAAACCTTCCGTGGTACGGAGTCAAATTCAGAAAATGCATTTCATCAATAATTCT			
ATTAAGAAGCTCGATACCTTGTTCCAATTATTCCTCTGATTGCGGAATTGGCTAAAGCGAAATTTGTAACGTATTGGGCATCCCAT			
AGTAAGCCGATTTCGGGCTGATTTATCAGATTCTAATATTATTGACCGATTGCGCGTATATGCAGAAATATTCTCATT			
TTAGATATACTAATACCTCGCTCTGTCC	A	TGTGGAAATCTTGATTCAAACCTCTTCGCCATTGGGTAAAAGATGTTTCTTCTTTGCATTTAT	B
TACGAGTCTTTCTCAACGAATATTGGAATTGGAGTA	A	TCTTCTTACTCCTCAAGAAAGTAAGCTTCTCTTTTCAAAAAGAAATCAAAGGT	
TATTTTTTTTCTTATACAATCTCATGTATGTGAATACGAATCTATTTTCACCTTTCTACGTAAACAATCTCTTCATTACGATCAACGCTCT			
TTGGAGTCTTCTTGAAGAATCTATTTCT	C	ATATAAAAAATAAAAGGTCTTATGAACACCTTTGTTAATAATTTTCAGGCGAACCTAGGGTT	
GGTCGAGGAACCTGTCATGCATTATATTAGGTATCAAAGAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGGGACATCCCTTTTCATGAATAAATGGA			
AATTTTACCTTGTCACCTTTTGGCAATGGCATTTTTCGGTGTGGTTTCATCCAAGAAGTATTTTGATAAACCAATTTTCCAAGCATTCCCT			
TGCAATTTTGGGCTATCTTTCAAACGTGCAAATAAACCTTCCGTGGTACGGAGTCAAATTCAGAAAATGCATTTCATCAATAATTCT			
ATTAAGAAGCTCGATACCTTGTTCCAATTATTCCTCTGATTGCGGAATTGGCTAAAGCGAAATTTGTAACGTATTGGGCATCCCAT			
AGTAAGCCGATTTCGGGCTGATTTATCAGATTCTAATATTATTGACCGATTGCGCGTATATGCAGAAATATTCTCATT			
TTAGATATACTAATACCTCGCTCTGTCC	A	TGTGGAAATCTTGATTCAAACCTCTTCGCCATTGGGTAAAAGATGTTTCTTCTTTGCATTTAT	C
TACGAGTCTTTCTCAACGAATATTGGAATTGGAGTA	A	TCTTCTTACTCCTCAAGAAAGTAAGCTTCTCTTTTCAAAAAGAAATCAAAGGT	
TATTTTTTTTCTTATACAATCTCATGTATGTGAATACGAATCTATTTTCACCTTTCTACATAAACAATCTCTTCATTACGATCAACGCTCT			
TTGGAGTCTTCTTGAAGAATCTATTTCT	T	ATATAAAAAATAAAAGGTCTTATGAACACCTTTGTTAATAATTTTCAGGCGAACCTAGGGTT	
GGTCGAGGAACCTGTCATGCATTATATTAGGTATCAAAGAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGGGACATCCCTTTTCATGAATAAATGGA			
AATTTTACCTTGTCACCTTTTGGCAATGGCATTTTTCGGTGTGGTTTCATCCAAGAAGTATTTTGATAAACCAATTTTCCAAGCATTCCCT			
TGCAATTTTGGGCTATCTTTCAAACGTGCAAATAAACCTTCCGTGGTACGGAGTCAAATTCAGAAAATGCATTTCATCAATAATTCT			
ATTAAGAAGCTCGATACCTTGTTCCAATTATTCCTCTGATTGCGGAATTGGCTAAAGCGAAATTTGTAACGTATTGGGCATCCCAT			
AGTAAGCCGATTTCGGGCTGATTTATCAGATTCTAATATTATTGACCGATTGCGCGTATATGCAGAAATATTCTCATT			

FIGURA 18 - SEQUÊNCIA DE BASES OBTIDA NO CONSENSO DA REGIÃO *matK* DE CADA INDIVÍDUO PRESENTE NAS POPULAÇÕES DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE). (A - CURITIBA; B - PALMEIRA; C - SÃO LUIZ DO PURUNÃ; LETRAS EM VERMELHO: LOCAIS DAS BASES DIVERGENTES NAS POSIÇÕES 29, 128 E 304, RESPECTIVAMENTE)

As sequências foram comparadas com as da base genômica de dados BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e BOLD (www.barcodinglife.com). Os três indivíduos (um indivíduo de cada população) de *Salvia lachnostachys* obtiveram maior índices de similaridade com *Salvia uliginosa* Benth. (2–3 bases), *Salvia rutilans* Carrière (8 bases), *Salvia farinacea* Epling (17 bases) e *Salvia guaranitica* A. St.-Hil. ex Benth. com diferença de 17 bases. Com essas espécies citadas anteriormente, o *e-value* foi de 0% e as sequências não apresentaram *gaps* (inserção ou deleção de alguma base na sequência). O *e-value* representa um valor estatístico que indica confiabilidade no alinhamento e baixa probabilidade de se obter outra sequência do mesmo tamanho e composição de letras no banco de dados genômico.

4.3.2.2 Sequenciamento da Região *rbcL*

Os resultados das reações de sequenciamento para a região do gene *rbcL* foram de boa qualidade para os três indivíduos de cada população de *Salvia lachnostachys*. Os eletroferogramas apresentaram intensidade de leitura acima de 100 e índice de confiabilidade entre 18–45, como mostra o exemplo da FIGURA 19.

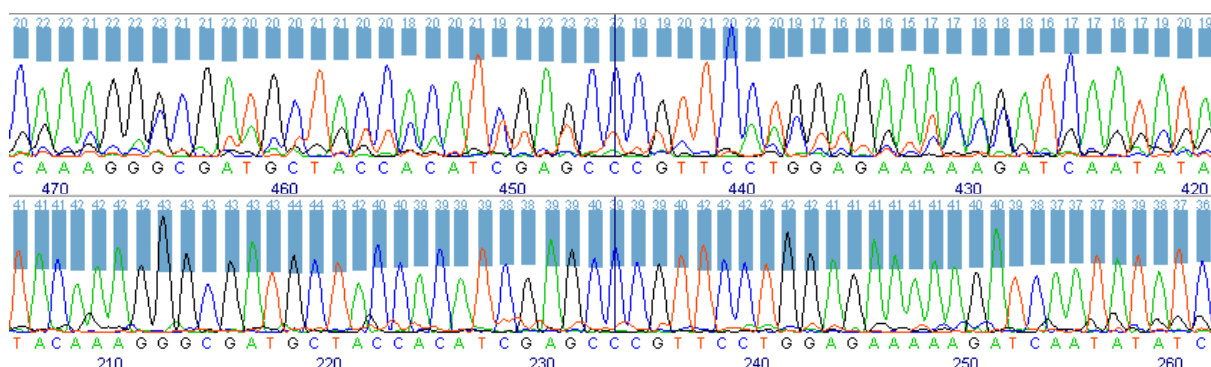


FIGURA 19 - TRECHO DO ELETROFEROGRAMA DA REGIÃO *rbcL* DA POPULAÇÃO DE PALMEIRA DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE). (AS BARRAS AZUIS SUPERIORES INDICAM O ÍNDICE DE CONFIABILIDADE; OS NÚMEROS EM AZUL ABAIXO DAS SEQUÊNCIAS INDICAM A QUANTIDADE DE BASES NITROGENADAS E OS PICOS EM CORES DIFERENTES INDICAM AS BASES NITROGENADAS)

Os indivíduos 3, 26 e 55, representados pelas populações de Curitiba, Palmeira e São Luiz do Purunã, respectivamente, obtiveram para a região *rbcL* 643 pares de bases. Comparando entre esses três indivíduos (um indivíduo de cada população) não houve divergências de pares de bases entre os mesmos (FIGURA 20).

```
GAGTACAAATTGACTTATTATACTCCTGAATACGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTC
CTCAACCTGGAGTTCCGCCTGAAGAAGCAGGGGCCGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAAC
TGTGTGGACCGATGGACTTACTAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATCGAGCCCGTTCTGGAG
AAAAAGATCAATATATCTGTTACGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACT
TCCATTGTAGGAAATGATTTGGATTCAAAGCTCTACGTGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCTCTGCT
TATATTAAACTTTCCAAGGCCCGCCTCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCT
CTGCTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAACTATGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTTC
GCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACCTCCAGCCATTATGCGTTGGAGAGACCGCTTC
TTATTTTGTGCCGAAGCAATTATAAATCACAGGCTGAAACAG
```

FIGURA 20 - SEQUÊNCIA DE BASES OBTIDAS NO CONSENSO DA REGIÃO *matK* DAS TRÊS POPULAÇÕES DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE)

As sequências foram comparadas com as da base genômica de dados BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e BOLD (www.barcodinglife.com). Os

indivíduos de cada população de *S. lachnostachys* obtiveram maiores níveis de similaridade com a espécie *Salvia uliginosa*, *Salvia subincisa* Benth. e *Salvia corrugata* Vahl em 99,84%, variando uma base entre os mesmos. Com essas espécies citadas anteriormente não houve nenhuma presença de *gaps* e o *e-value* foi de 0%.

4.3.3 Variabilidade Genética

4.3.3.1 Amplificação do DNA pela Técnica PCR-ISSR

As reações de PCR realizadas com o DNA dos 73 indivíduos representantes das três populações (Curitiba, Palmeira e São Luiz do Purunã) de *Salvia lachnostachys* foram bem sucedidas para os nove iniciadores escolhidos, como demonstra a FIGURA 21.

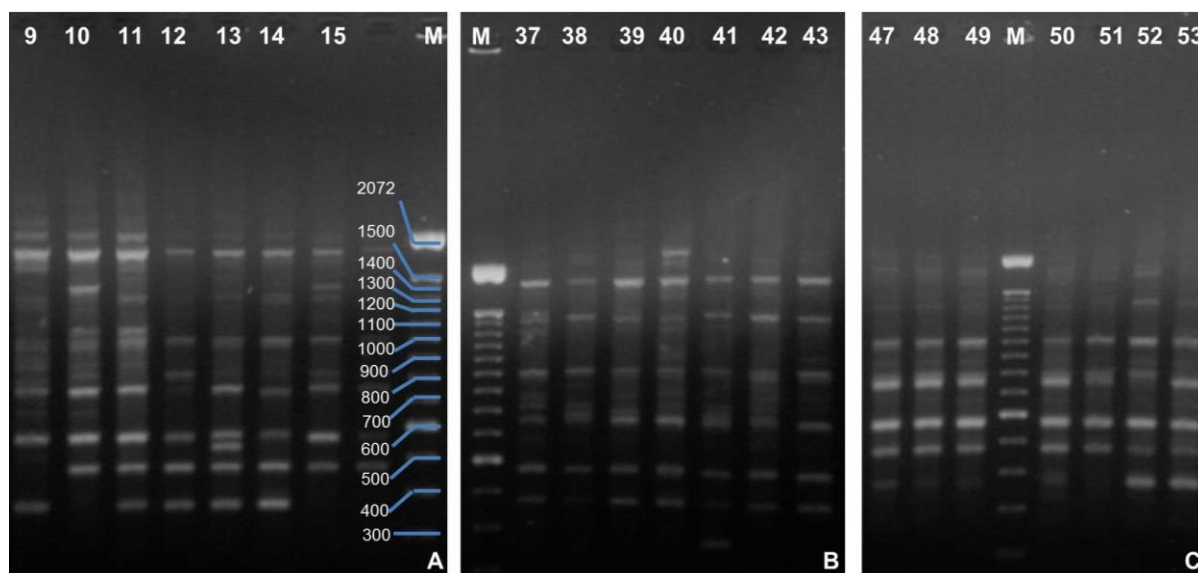


FIGURA 21 - GEL DE ELETROFORESE APRESENTANDO O PADRÃO DAS BANDAS PCR-ISSR GERADAS COM O INICIADOR (CTC)₄RC DA ESPÉCIE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE). A - CURITIBA; B - PALMEIRA; C - SÃO LUIZ DO PURUNÃ. (9-15 INDIVÍDUOS DE CURITIBA; 37-43: INDIVÍDUOS DE PALMEIRA; 47-53: INDIVÍDUOS DE SÃO LUIZ DO PURUNÃ; M: MARCADOR: 2072 - 300 pb)

4.3.3.2 Análise dos Iniciadores

Nas análises dos géis, alguns indivíduos não foram amplificados, ou seja, não houve formação de fragmentos de DNA, assim o número de indivíduos variou para cada iniciador, totalizando 639 avaliações. Na TABELA 1, foi verificado o total de indivíduos empregados inicialmente, os indivíduos descartados por não ter formado fragmentos de DNA e aqueles que realmente foram utilizados nas análises posteriores.

TABELA 1 - RELAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE INDIVÍDUOS AMPLIFICADOS, INDIVÍDUOS DESCARTADOS POR FALTA DE AMPLIFICAÇÃO E INDIVÍDUOS EMPREGADOS NAS ANÁLISES PARA CADA INICIADOR PARA O ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA COM *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE.

INICIADOR	TOTAL DE INDIVÍDUOS	INDIVÍDUOS DESCARTADOS	INDIVÍDUOS UTILIZADOS
(AC) ₈ T	72	3	69
(AG) ₈ A	73	-	73
(AG) ₈ C	73	1	72
(AG) ₈ YC	67	3	64
(AG) ₈ YT	72	-	72
(CA) ₈ G	72	-	72
(CT) ₈ A	69	4	65
(CTC) ₄ RC	71	1	70
(GA) ₈ T	70	1	69

Os géis de agarose contendo os fragmentos de DNA amplificados foram analisados pelo *GelAnalyzer*. Este *software* mostra o número de fragmentos de DNA observados no gel para cada indivíduo, o tamanho de cada fragmento relativo ao padrão e a intensidade desses fragmentos (FIGURA 22). Entretanto, foi analisado cada gel individualmente, descartando os “falso-positivos” encontrados pelo *software*.

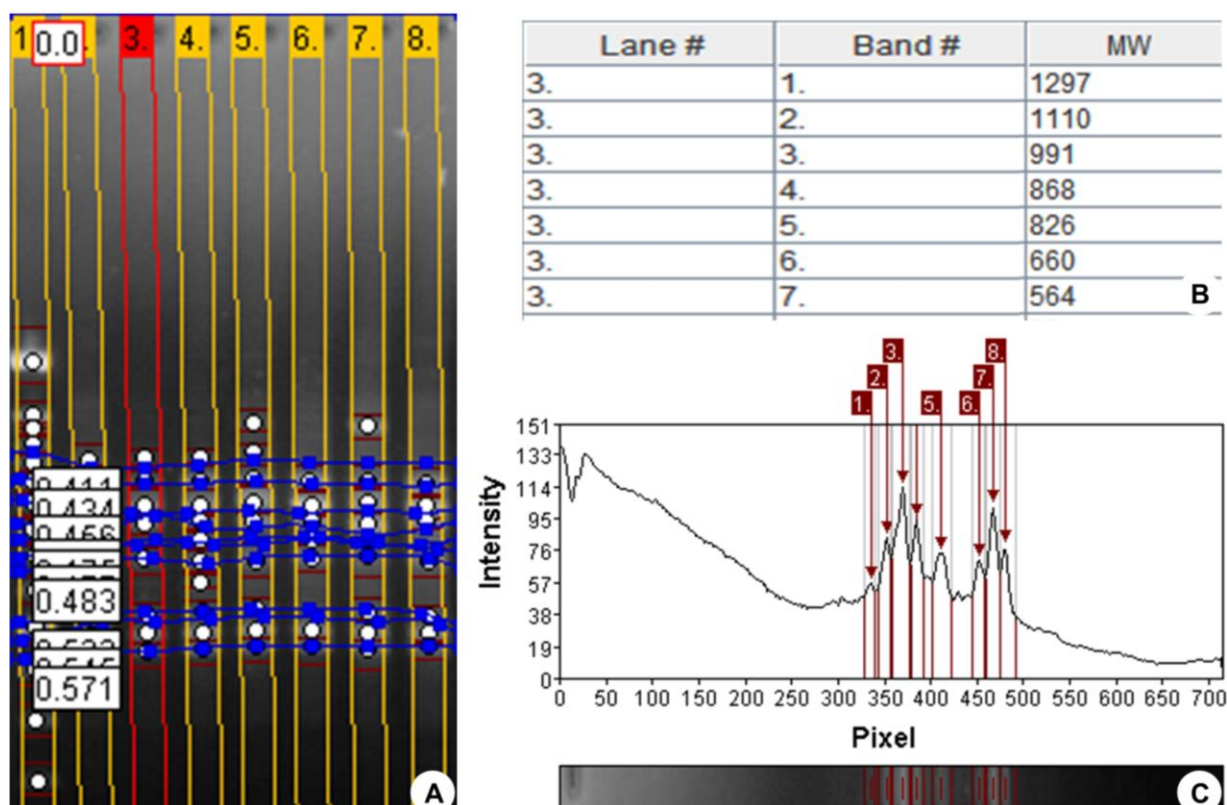


FIGURA 22 - ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DE DNA NO SOFTWARE GELANALYZER, MOSTRANDO AS BANDAS FORMADAS E SUAS QUANTIDADES (A), O TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE DNA (B) E A INTENSIDADE DAS MESMAS (C) PARA O ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA COM *Salvia lachnostachys* BENTH., LAMIACEAE

Para cada iniciador foi encontrado um perfil de fragmentos de DNA com variações dentro da própria população e entre as populações.

As análises por ISSR produziram entre 10–22 bandas amplificadas (*loci*) por iniciador com média de 17,6 fragmentos polimórficos. Das 159 bandas amplificadas, 152 foram polimórficas. A porcentagem das bandas polimórficas variou de 86% a 100%, (média de 95,6%). A variação do tamanho dos fragmentos ficou entre 250–2.200 pares de base. A precisão dos dados estimados com 159 *loci* revelou um alto valor de correlação chegando a 0,39 com 10 *loci*, 0,87 com 80 e 0,99 com 150. O valor de estresse com os 150 *loci* foi de 0,02. O índice de Simpson de cada iniciador variou de 0,66 a 0,86 (0,79 de média). No geral, os iniciadores que apresentaram o mais alto grau de polimorfismo foram (AG)₈YC e (AG)₈A (TABELA 2).

TABELA 2 - SEQUÊNCIA DOS NOVE INICIADORES, NÚMERO DE BANDAS, NÚMERO E PORCENTAGEM DE BANDAS POLIMÓRFICAS E ÍNDICE DE SIMPSON DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE).

SEQUÊNCIA (5'→ 3')	NÚMERO DE BANDAS	NÚMERO DE BANDAS POLIMÓRFICAS	PORCENTAGEM DE BANDAS POLIMÓRFICAS (%)	ÍNDICE DE SIMPSON
(AC) ₈ T	14	13	93	0,79
(AG) ₈ A	12	11	92	0,84
(AG) ₈ C	20	20	100	0,83
(AG) ₈ YC (C ou T)	22	22	100	0,86
(AG) ₈ YT (C ou T)	19	19	100	0,77
(CA) ₈ G	19	19	100	0,78
(CT) ₈ A	10	10	100	0,66
(CTC) ₄ RC (A ou G)	22	19	86	0,77
(GA) ₈ T	21	19	90	0,80
TOTAL	159	152	95,6	0,79
MÉDIA	17,6			

4.3.3.3 Variação Gênica

Os parâmetros utilizados para avaliação da variabilidade genética estão resumidos na TABELA 3.

TABELA 3 - VARIABILIDADE GENÉTICA DAS TRÊS POPULAÇÕES DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE).

Populações	N	M	NPB	PPB	Ao	Ae	H	I
Curitiba	23	23	130	81,76	1,820	1,390	0,2402	0,3713
Palmeira	24	23	121	76,10	1,761	1,334	0,2096	0,3284
São Luiz Purunã	26	25	111	69,81	1,698	1,330	0,2021	0,3126
Total	73	70	155	97,48	1,974	1,392	0,2509	0,3982

N = número de indivíduos; M = número de indivíduos polimórficos; NPB = número de bandas polimórficas; PPB = porcentagem de bandas polimórficas; Ao = número de alelos observados; Ae = número de alelos esperados; H = diversidade gênica de Nei; I = índice de Shannon.

A porcentagem de bandas polimórficas entre as populações variou entre 69,81%–81,76% (média de 97,48%). O número de alelos observados (Ao) e o

número de alelos esperados (Ae) foram de 1,698 a 1,820 e de 1,330 a 1,390, respectivamente. A diversidade gênica de Nei (H) e o índice de Shannon (I) dos diferentes grupos geográficos variaram de 0,2021 a 0,2402 e de 0,3126 a 0,3713, respectivamente. A população de Curitiba mostrou a mais alta variação gênica e a de São Luiz do Purunã a mais baixa.

4.3.3.4 Estrutura Genética das Populações

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que a variação genética majoritária ocorreu dentro das populações. A diferenciação genética entre as populações foi de 16,80% ($G_{ST} = 0,1678$) e dentro das populações foi de 81,76%. O fluxo gênico ($N_m = 2,4806$) indicou uma diferenciação genética entre as populações.

A análise de agrupamento gerou um dendrograma (FIGURA 23), em que a procedência geográfica de cada indivíduo pode ser recuperada dentro de quatro grupos maiores. A topologia sugeriu a formação de quatro grupos principais: indivíduos de Curitiba (1–23); Palmeira (um grupo: 31–38 e outro grupo: 24–30 e 39–47) e São Luiz do Purunã (48–73). A relação genética dos indivíduos foi observada usando a análise do componente principal (PCA). A análise por PCA (FIGURA 24) permitiu o reconhecimento das populações em relação a sua origem geográfica.

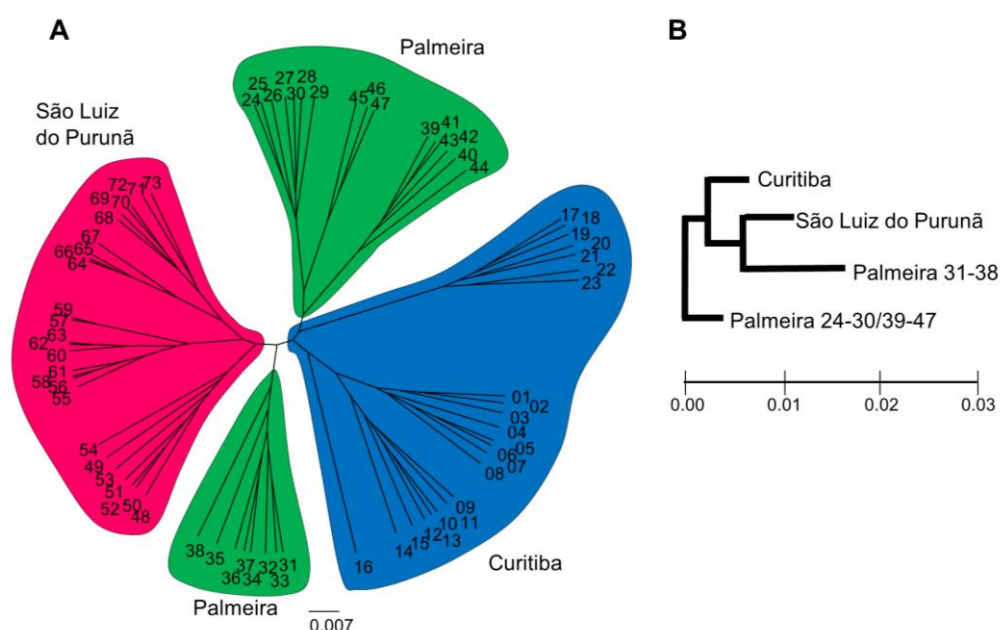


FIGURA 23 - RELAÇÃO GENÉTICA DE 73 INDIVÍDUOS DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE) BASEADA NO MARCADOR ISRR, AMBOS REALIZADOS POR ANÁLISE UPGMA

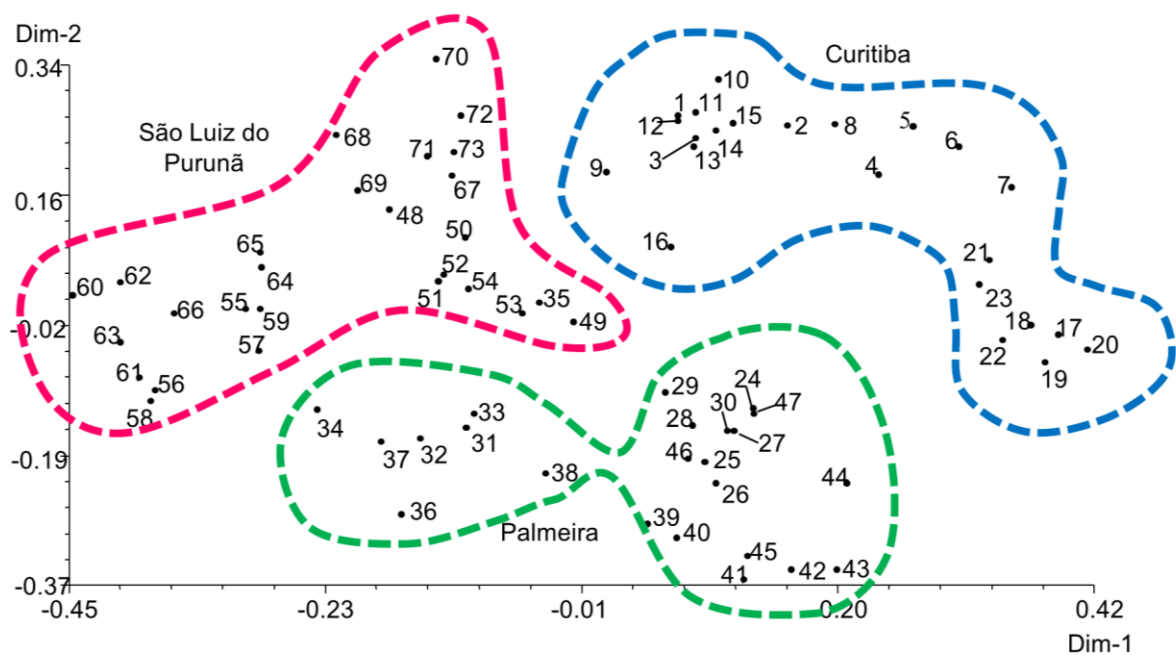


FIGURA 24 - RELAÇÃO GENÉTICA DE 73 INDIVÍDUOS DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE) BASEADA NO MARCADOR ISRR. ANÁLISE DO COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) AGRUPADA POR POPULAÇÃO

Após a aplicação do modelo sugerido por Evanno, Regnaut e Goudet (2005), o maior valor de K (ΔK) encontrado como sendo o mais provável número de populações estudadas é de k igual a três (FIGURA 25).

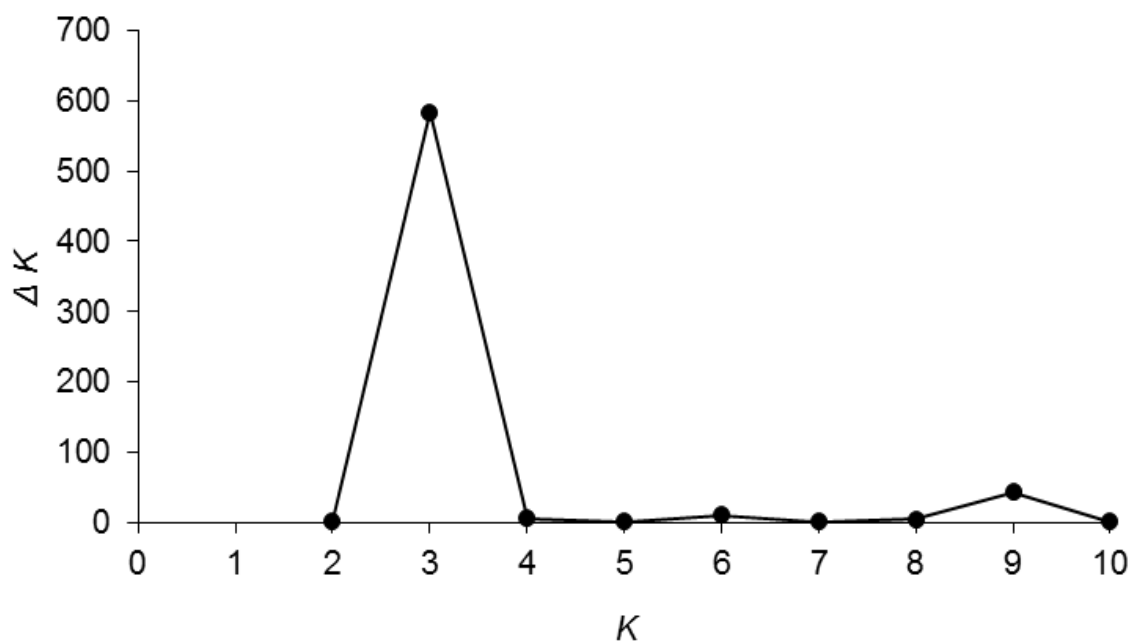


FIGURA 25 - GRÁFICO MOSTRANDO O NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE POPULAÇÕES ESTUDADAS, SEGUNDO A ESTATÍSTICA DE EVANNO, REGNAUT E GOUDET (2005)

O estudo populacional de *S. lachnostachys* indicou uma estrutura genética heterogênea (FIGURA 26). A população de Palmeira mostrou uma maior variação entre as três populações a as populações de Curitiba e de São Luiz de Purunã mostraram ser as mais conservadas. Também é possível observar que alguns indivíduos de Palmeira (31–38) apresentaram maior probabilidade de pertencer à população de São Luiz do Purunã (48–73) e que alguns de Palmeira (24–30 e 39–47) à população de Curitiba (1–23).

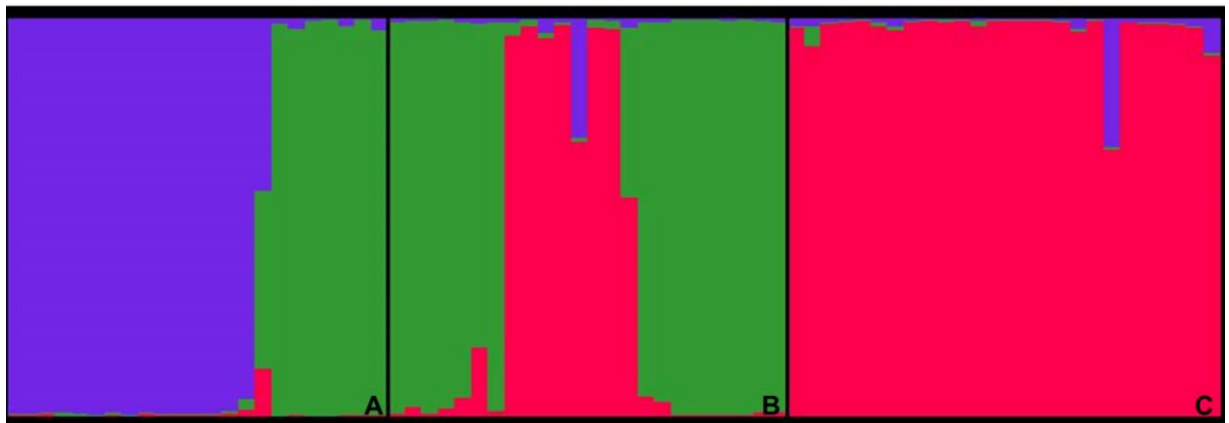


FIGURA 26 - ESTRUTURA DAS TRÊS POPULAÇÕES DE *Salvia lachnostachys* BENTH. (LAMIACEAE) COM MARCADOR ISSR. A - CURITIBA; B - PALMEIRA; C - SÃO LUIZ DO PURUNÃ. A LINHA PRETA REPRESENTA A SEPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS PRINCIPAIS

5 DISCUSSÃO

Em relação à distribuição de *Salvia lachnostachys* no Brasil, há ocorrência nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, sendo que nesses dois últimos Estados foi encontrado apenas na fronteira com o Paraná. As principais coletas são no Paraná, principalmente nos planaltos de Curitiba e Ponta Grossa, entretanto ocorrem também em outras regiões do Paraná (HARLEY *et al.*, 2013). Assim, as populações selecionadas para a tese foram de acordo com o ano e a quantidade de indivíduos coletados em determinada área.

A descrição morfoanatômica dos vegetais é importante tanto para a caracterização e identificação da planta como para o conhecimento da flora da região, podendo encontrar caracteres específicos da espécie, designados como marcadores. Esses marcadores podem estar relacionados à forma ou a um padrão fenotípico/genotípico de uma dada característica, servindo para discriminar as espécies, se houver dificuldade de distinção entre elas (SONAGLIO *et al.*, 2004).

A morfologia da espécie *Salvia lachnostachys* descrita neste trabalho é concordante com as publicações de Bentham (1832-1836) e Epling (1937; 1939), entretanto ambas as descrições são curtas e sem ilustrações.

Folhas opostas, flores bilabiadas e bissexuais, presença de dois estames férteis, dois carpelos com quatro núculas, estilete ginobásico e estigma bifido, são características frequentes na família Lamiaceae (HARLEY *et al.*, 2004), as quais foram também apontadas para *S. lachnostachys*.

Salvia lachnostachys pode ser diferenciada de outras espécies da mesma seção Uliginosae, pelo tipo de caule, formato do limbo foliar e inflorescência (quantidade de flores por verticilastro e brácteas) (QUADRO 9).

Espécie de <i>Salvia</i>	Caule	Formato do Limbo	Ápice do Limbo	Base do Limbo	Bráctea	Flores / verticilastro
<i>S. congestiflora</i> Epling	Ereto	Oval-lanceolado	Agudo	Arredondada	Caduca	3-6
<i>S. curta</i> Epling	Ereto	Elíptico-oval	Agudo	Cuneada	Caduca	6 ou mais
<i>S. lachnostachys</i> Benth.	Prostrado ascendente	Elíptico	Obtuso	Arredondada	Persistente	6 ou mais
<i>S. procurrens</i> Benth.	Prostrado	Arredondado	Agudo	Cordada	Persistente	2-6
<i>S. uliginosa</i> Epling	Ereto	Oblongo-lanceolado	Agudo	Cuneada	Caduca	6 ou mais

QUADRO 9 - DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE ESPÉCIES DE *Salvia* BRASILEIRAS DA SEÇÃO ULIGINOSAE
Fonte: Epling; Toledo, 1943

Quanto à anatomia, *S. lachnostachys* apresenta caracteres de ocorrência comum em Lamiaceae, tais como caule quadrangular com células colenquimáticas nos quatro ângulos, estômatos diacíticos e mesofilo dorsiventral (METCALFE; CHALK, 1950). Essas características revelaram-se de pouco valor taxonômico para a distinção de espécies, uma vez que estão presentes na maioria dos representantes da família e do gênero.

A distribuição dos estômatos nas folhas pode variar muito nas espécies. Nas Lamiaceae é comum sua presença em uma ou em ambas as faces e é característico ser classificado como diacítico (METCALFE; CHALK, 1950). A espécie em estudo apresentou estômatos do tipo diacítico em ambas as faces, corroborando com os dados de Metcalfe e Chalk (1950), assim como também ocorreu com *S. procurrens* (NOVOA; MONTI; XIZCAÍNO, 2005). Para Rudall (1979), a ocorrência de estômatos em ambas as faces é devido ao tipo de hábitat da planta, geralmente em plantas xerófitas, como na espécie estudada.

A constância de tricomas tectores e glandulares, principalmente o tricoma glandular com pedicelo curto e cabeça uni ou multicelular, é característica de toda a família Lamiaceae, sendo um caractere valioso para a identificação de gênero e espécie (METCALFE; CHALK, 1950). Singh, Sharma e Jain (1974) examinaram diversas espécies de *Salvia* com intuito de descrever os tricomas glandulares. Segundo eles, o gênero apresenta dois tipos de tricomas glandulares: peltado e capitado. O tricoma peltado, típico das Lamiaceae, compreende uma cabeça globosa com uma ou várias células secretoras, um pedicelo curto e uma célula epidérmica basal. No presente estudo foi observado tanto a presença de tricomas tectores como tricomas glandulares peltados e capitados, em concordância com as observações de Metcalfe e Chalk (1950) e de Singh, Sharma e Jain (1974). Em comparação com *S. procurrens* (NOVOA; MONTI; XIZCAÍNO, 2005), espécie da mesma seção, apresenta tricomas glandulares do tipo capitado apenas, diferenciando de *S. lachnostachys*.

A organização estrutural dos feixes vasculares do pecíolo é uma das características diagnósticas na família Lamiaceae (METCALFE; CHALK, 1950). Em *S. lachnostachys* ocorre um feixe vascular maior no centro e dois feixes menores em cada ala do pecíolo, sendo evidenciado dois feixes vasculares maiores no centro e dois feixes menores em cada ala do pecíolo em *S. procurrens* (NOVOA; MONTI; XIZCAÍNO, 2005).

Na espécie em estudo, foi verificada a presença de compostos fenólicos e terpenoides, que possivelmente são equivalentes aos compostos presentes na família (HARLEY *et al.*, 2004). Esse mesmo grupo de metabólitos secundários foi verificado, na presente pesquisa para *S. lachnostachys*, e em outras espécies da família (BISIO *et al.*, 1999; SERRATO-VALENTI *et al.*, 1997; CORSI; BOTTEGA, 1999).

Usando o método BOLD e BLAST, tanto as regiões *matK* como a *rbcL* obtiveram 99% de similaridade com outras espécies de *Salvia*, inclusive *S. uliginosae* que pertence à mesma seção que *S. lachnostachys* (seção Uliginosae). Os dados obtidos neste trabalho demonstram que a região *matK* pode distinguir indivíduos da mesma espécie, enquanto que a região *rbcL* distingue somente as espécies diferentes.

Foi observado que, em *S. lachnostachys*, na região *matK*, houve a divergência de uma base (A por G) na posição 318 com *S. uliginosa*, podendo ser considerada como marcador molecular. Na região *rbcL*, não ocorreu essa constância na divergência entre *S. lachnostachys* e as espécies *S. uliginosa*, *S. rutilans* e *S. farinacea*.

Entretanto, Wang e seus colaboradores (2013) em estudo com 27 espécies de *Salvia*, relataram que a região nuclear ITS1 seria a melhor opção como código de barras para o gênero, principalmente para *S. miltiorrhiza*. O número de sequências de *Salvia* depositadas nos bancos de dados são ainda insuficientes para concluir sobre a eficiência das regiões *matK* e *rbcL* propostas pelo CBOL (2009), mas foi suficiente para diferenciar *S. lachnostachys* de espécies relacionadas.

O conhecimento da variabilidade genética das populações naturais é importante para acessar de forma eficiente os recursos genéticos e para a conservação do germoplasma principalmente de espécies com interesse farmacológico.

Devido à crescente pressão humana sobre as áreas naturais onde os espécimes em estudo ocorrem, foram encontrados nestas análises índices elevados de variabilidade genética (PPB = 97,48%, I = 0,3982). Esse resultado sugere que os indivíduos de *S. lachnostachys* são relativamente capazes de se adaptar às mudanças do ambiente, fornecendo uma ótima oportunidade de estudo, coleta e conservação de *S. lachnostachys*, além de discutir estratégias de amostragem para compor os bancos de germoplasma. Tais ações poderiam reduzir a perda da

diversidade e da erosão genética encontrada em espécies cultivadas. Estudos comparativos revelaram que espécies cultivadas têm uma menor variabilidade genética, isso ocorre devido à propagação que é assistida pelo ser humano ou devido à troca de germoplasma (HONG *et al.*, 2007; GE *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2010).

Analisando o valor de estresse com os 150 *loci* foi possível observar que o mesmo, que foi 0,02, está dentro dos padrões, que são valores menores que 0,05.

Observando o índice de Simpson, a amostragem utilizada é relevante e sugere um nível aceitável de precisão com os iniciadores selecionados. A capacidade de discriminação dos iniciadores selecionados pode ser avaliada com os valores calculados para o índice de Simpson (TABELA 2). Esses iniciadores podem ser utilizados como um ponto de partida para estudos populacionais em *Salvia*.

Populações selvagens de *S. miltiorrhiza* foram avaliadas utilizando AFLP (WANG *et al.*, 2007). A média da diversidade gênica de Nei encontrada ($H = 0,2612$) foi consistente ao encontrado em nossa avaliação atual para *S. lachnostachys* ($H = 0,2509$). Se comparadas, as populações naturais de *S. miltiorrhiza* e *S. lachnostachys* com a população cultivada de *S. miltiorrhiza*, esta revelou um valor médio inferior ($H = 0,1951$) de diversidade gênica de Nei (SONG *et al.*, 2010). Especialmente para essas comparações, é importante lembrar que o índice de diversidade gênica de Nei é uma estimativa da heterozigosidade esperada. No estudo corrente, considerando um marcador dominante, a diversidade gênica é derivada a partir das frequências de alelos esperados previamente calculados. Portanto, o índice possui algumas limitações e sua precisão depende da validade da hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Por essa razão, as comparações de valores de diversidade gênica de Nei de estudos usando diferentes classes de marcadores não devem ser feita diretamente. Para ambos os estudos citados anteriormente em *Salvia* (WANG *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2010), foram utilizados marcadores dominantes (RAPD e ISSR). Outra questão relacionada às comparações de diversidade gênica de Nei é que diferentes marcadores têm diferentes habilidades para evidenciar polimorfismos. Por exemplo, muitos autores apontam que os marcadores ISSR detectam maior número de regiões polimórficas se comparados com outros marcadores, como RAPD (1998; GE; SUN, 1999; CAMACHO; LISTON, 2001). Por conseguinte, o índice deve ser considerado como um indicativo e comparações devem avaliar essas diferenças. Os valores do índice

de diversidade de Shannon reforçam a diversidade gênica encontrada nas espécies e nos níveis populacionais.

O dendrograma não enraizado obtido na análise de grupos foi eficaz para recuperar as localidades amostradas em quatro grupos maiores com base nas distâncias genéticas de Nei e Li (1979). O mesmo sugere uma diferenciação consistente entre as populações amostradas. A alta variabilidade genética mantida dentro das populações é encorajador, entretanto não se esperava uma separação dos indivíduos de Palmeira em dois grupos distintos. Essa bifurcação pode estar relacionada a várias causas, tais como a origem da diferenciação genética e o fluxo gênico, os quais são considerados índices importantes para avaliar a estrutura genética da espécie. Nesse estudo, o valor de G_{ST} em *S. lachnostachys* foi de 0,1678, indicando que a variação total existe dentro da população e em menor grau entre populações. Esse resultado foi coerente com o encontrado para *S. miltiorrhiza* cujo valor foi de 0,1336. Muitos fatores estão envolvidos na determinação da estrutura genética da população de plantas, alguns deles são: biologia reprodutiva, fluxo gênico, dispersão de sementes e seleção natural. Em especial, a biologia reprodutiva desempenha um papel central na estrutura genética (ZHAO *et al.*, 2007a, b). É concebível que a estratégia de fecundação cruzada documentada para o gênero *Salvia* (VAN TREUREN *et al.*, 1993; BIJLSMA; OUBORG; VAN TREUREN, 1994) seja responsável pela maior variabilidade dentro das populações. Isso é particularmente provável devido à alta densidade populacional, na qual as taxas de cruzamento são mais elevadas.

A elevada capacidade de adaptação de *S. lachnostachys* também pode ser responsável em manter a baixa diferenciação entre as populações. O elevado número de migrantes (N_m) reforça a existência de um forte mecanismo de troca de alelos entre populações. A reprodução vegetativa (brotamento) pode reintroduzir alelos depois de um evento de extinção, como incêndio, em uma única subpopulação. Entretanto, a disseminação de sementes e a polinização contribuem fortemente para o fluxo gênico em populações naturais de plantas (LI; CHEN, 2004). Em relação à polinização com espécies de *Salvia* do Novo Mundo, a qual *S. lachnostachys* se encontra, é realizada por abelhas, que são insetos com baixa capacidade de alçar voos de grandes distâncias (CLAßEN-BOCKHALL; WESTER; TWERASER, 2003). Assim, a disseminação por sementes é a mais provável forma de fluxo gênico entre os indivíduos de *S. lachnostachys*.

É possível conceber que o vento seja capaz de conectar as áreas de estudo entre as populações examinadas. Além disso, as principais estradas que atravessam essas áreas podem também funcionar como um corredor para os insetos, os principais polinizadores das espécies de *Salvia*. A troca de material genético também foi observada em outras espécies como *S. miltiorrhiza* onde o N_m foi de 3,2362 (SONG *et al.*, 2010), análogo ao valor encontrado no presente estudo, onde N_m é de 2,4806. É possível que esse nível de migração seja suficiente para neutralizar a diferenciação genética causada pela deriva genética dentro das populações individuais, que explicam a baixa diferenciação entre as populações (WANG, 2004).

Os resultados obtidos a partir da estrutura de todas as populações apresentaram um valor de $K = 3$, propondo que é possível distinguir três grupos geneticamente diferentes com genótipos. A atribuição estrutural ajudou a esclarecer a topologia encontrada no dendrograma UPGMA não enraizado. As amostras entre 1–23 (coletadas em Curitiba) foram indicadas pela mistura da análise Bayesiana como semelhante a genótipos coletados de Palmeira (24–44), e amostras coletadas em Palmeira de 31–38 foram indicadas como semelhante a genótipos de São Luiz do Purunã, reforçando a alta troca gênica e a baixa diferenciação entre as populações.

6 CONCLUSÃO

A descrição morfoanatômica, os testes microquímicos e o sequenciamento de duas regiões plastidiais da espécie *Salvia lachnostachys* são importantes para sua caracterização e correta identificação.

Os caracteres macro e microscópicos de *S. lachnostachys* apresentaram características diagnósticas da família Lamiaceae e do gênero *Salvia*. Entretanto, foi observado que, entre espécies relacionadas, os caracteres de diagnose são: hábito da planta, organização das inflorescências (brácteas persistentes e quantidade de flores por verticilastro) e a organização do sistema vascular do pecíolo. Os resultados das análises morfoanatômicas foram publicadas no *Microscopy Research and Technique* em 2012 (ANEXO).

O conjunto das sequências das regiões *matK* e *rbcL* possibilitam a correta identificação de *S. lachnostachys*, como código de barras para plantas terrestres.

Tanto a descrição morfoanatômica como o sequenciamento das duas regiões são resultados inéditos para *Salvia lachnostachys* e contribuem para sua correta identificação.

Os iniciadores empregados tanto por outros autores (QUADRO 7) como no presente trabalho indicam que são um ponto de partida para outros trabalhos com espécies do gênero *Salvia*, pois empregando esses iniciadores houve a amplificação e a detecção de bandas polimórficas.

A variabilidade genética entre as três populações é maior em Curitiba ($H = 0,2402$) e menor em São Luiz do Purunã ($H = 0,2021$). Segundo a AMOVA, a diferenciação genética é maior dentro das populações (81,76%) do que entre as populações (16,80%).

De acordo com a relação genética dos 73 indivíduos de *S. lachnostachys* tanto o dendrograma como a PCA permitem identificar a origem geográfica de cada indivíduo em cada um dos quatro grupos maiores. A estrutura populacional foi delimitada em três possíveis populações com similaridade entre elas.

Assim, para resgatar e conservar efetivamente a variabilidade genética de *S. lachnostachys* para a formação de um banco de germoplasma e/ou para propagação, ainda que as populações estejam muito próximas em sua composição genética, sugerem-se como prioridade os dois grupos do município de Palmeira.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, G.; ECHEVERRIGARAY, S.; SOUZA-CHIES, T. T. Genetic relationships among South American species of *Cunila* D. Royen ex L. based on ISSR. **Plant Systematics and Evolution**, v. 274, p. 135–141, 2008.
- ALMEIDA, R. B.; BARETTA, I. P.; SANTOS, E. P.; STEFANELLO, M. E. A.; KASSUYA, C. A. L.; ANDREATINI, R. Envolvimento do sistema gabaérgico na atividade ansiolítica do extrato de *Salvia lachnostachys* Benth. em camundongos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 21., 2010, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: UFPB, 2010.
- ALTSCHUL, S. F. Basic local alignment search toll. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1993. 511 p.
- BAILEY, C. E.; DAY, C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. **Diabetes Care**, v. 12, p. 553–564, 1989.
- BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Herbal medicines**. 2nd ed. London: Pharmaceutical Press, 2007. p. 512–514.
- BAUR, B.; SCHMID, B. Spatial and temporal patterns of genetic diversity within species. In: GASTON, K. J. **Biodiversity, a biology of numbers and differences**. Oxford: Blackwell, 1996. p. 169–201.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. p. 33–37.
- BENTHAM, G. **Labiatum genera et species or a description of the genera and species of plants of the order Labiatae**. London: James Moyes, 1832–1836. 313 p.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976. 326 p.
- BERMUDEZ, J. A. Z. **Indústria farmacêutica, estado e sociedade**. São Paulo:

Hucitec, 1995. 204 p.

BIJLSMA, R.; OUBORG, N. J.; VAN TREUREN, R. On genetic erosion and population extinction in plants: a case study in *Scabiosa columbaria* and *Salvia pratensis*. **Conservation Genetics**, v. 68, p. 255–271, 1994.

BISIO, A.; CORALLO, A.; GASTALDO, P.; ROMUSSI, G.; CIARALLO, G.; FONTANA, N.; DE TOMMASI, N.; PROFUMO, P. Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandege ex Epling grows in Italy. **Annals of Botany**, v. 83, p. 441–452, 1999.

BLAST. *Basic Local Alignment Search Tool*. Disponível em: <blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 22/11/2013.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, p. 209–215, 2001.

BrBOL. *Brazilian Barcode of Life*. Disponível em: <brbol.org/pt-br>. Acesso em: 09/01/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução n. 48, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/docs/Resolucao%20RDC%2048%20de%2016032004.PDF>>. Acesso em: 22/5/2013.

BRUNETON, J. **Farmacognosia: fitoquímica e plantas medicinais**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2001. p. 534–538.

CAHILL, J. P. Ethobotany of Chia, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). **Economic Botany**, v. 57, p. 604–618, 2003.

CAMACHO, F. J.; LISTON, A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 1065–1070, 2001.

CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 12794–12797, 2009.

CERVI, A. C.; VON LINSINGEN, L.; HATSCHBACH, G.; RIBAS, O. S. A vegetação do Parque Estadual de Vila Velha, Município de Ponta Grossa, PR-BR. **Boletim do Museu Botânico Municipal**, n. 69, 2007.

CHASE, M. W.; COWAN, R. S.; HOLLINGSWORTH, P. M.; VAN DER BERG, C.; MADRINAN, S.; PETERSEN, G.; SEBERG, O.; JORGENSEN, T.; CAMERON, K. M.; CARINE, M.; PEDERSEN, N.; HEDDERSON, T. A. J.; CONRAD, F.; SALAZAR, G.; RICHARDSON, J. E.; HOLLINGSWORTH, M. L.; BARRACLOUGH, T. G.; KELLY, L.; WILKINSON, M. A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. **Taxon**, v. 56, p. 295–299, 2007.

CHENG, T. O. Danshen: what every cardiologist should know about this Chinese herbal drug. **International Journal of Cardiology**, v. 110, p. 411–412, 2006a.

CHENG, T. O. Danshen: aversatile Chinese herbal drug for the treatment of coronary heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 113, p. 437–438, 2006b.

CHENG, T. O. Cardiovascular effects of Danshen. **International Journal of Cardiology**, v. 121, p. 9–22, 2007.

CLAßEN-BOCKHOFF, R.; WESTER, P.; TWERASER, E. The stamina lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae) - a review. **Plant Biology**, v. 5, p. 22–41, 2003.

CLAßEN-BOCKHOFF, R.; CRONE, M.; BAIKOVA, E. Stamen development in *Salvia* L.: homology reinvestigated. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, p. 475–498, 2004.

CLAßEN-BOCKHOFF, R.; SPECK, T.; TWERASER, E.; WESTER, P.; THIMM, S.; REITH, M. The stamina lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a key innovation for adaptive radiation? **Organisms, Diversity and Evolution**, v. 4, p. 189–205, 2004.

CORSI, G.; BOTTEGA, S. Glandular hairs of *Salvia officinalis*: new data on morphology, localization and histochemistry in relation to function. **Annals of Botany**, v. 84, p. 657–664, 1999.

COSTA, A. F.; PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2000.

COSTA, H. N. R.; SANTOS, M. C.; ALCÂNTARA, A. F. C.; SILVA, M. C.; FRANÇA, R. C.; PILÓ-VELOSO, D. Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Petodon radicans* (Lamiaceae). **Química Nova**, v. 31, p. 744–750, 2008.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: biometria. Viçosa: UFV, 2006.

DALLA-VECHIA, L.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMAMM, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, antiinflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, p. 1245–1252, 2009.

DARIAS, V.; BRAVO, L.; BARQUIN, R.; MARTÍN, D.; FRAILE, C. Contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. **Journal Ethnopharmacology**, v. 15, p. 169–193, 1986.

DELAMARE, A. N.; MOSCHEN-PISTORELLO, I. V.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oil of *Salvia officinalis* L. e *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, p. 603–608, 2007.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.

DUNNING, L. T.; SAVOLAINEN, V. Broad-scale amplification of matK for DNA barcoding plants, a technical note. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 164, p. 1–9, 2010.

EPLING, C. *Salvia* in Synopsis of South American Labiatae. **Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis**, v. 85, p. 27–130, 1937.

EPLING, C. A revision of *Salvia* subgenus *Calosphace*. **Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis**, v. 110, p. 1–160, 1939.

EPLING, C.; TOLEDO, J. F. **Flora Brasileira**: Labiadas. São Paulo: Graphicars, 1943. v. 48. fasc. 7. 107 p.

ERBANO, M.; EHRENFRIED, C. A.; STEFANELLO, M. E.; SANTOS, E. P. Morphoanatomical and phytochemical studies of *Salvia lachnostachys* (Lamiaceae). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1737–1744, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479–491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47–50, 2005.

FAN, H. Y.; FU, F. H.; XU, H.; ZHANG, A. H.; LIU, R. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A. **Thrombosis Research**, v. 126, p. 17–22, 2010.

FAY, M. F.; SWENSEN, S. M.; CHASE, M. W. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). **Kew Bulletin**, v. 52, p. 111–120, 1997.

FAZEKAS, A. J.; BURGESS, K. S.; KESANAKURTI, P. R.; GRAHAM, S. W.; NEWMASER, S. G.; HUSBAND, B. C.; PERCY, D. M.; HAJIBABAEI, M.; BARRETT, S. C. H. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant sciences equally well. **PlosOne**, v. 3, e2802, 2008.

FONTANA, G.; SAVONA, G.; RODRÍGUEZ, B. Clerodane diterpenoids from *Salvia splendens*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1734–1738, 2006.

FORD, C. S.; AYRES, K. L.; TOOMEY, N.; HAIDER, N.; STAHL, J. V. A.; KELLY, L. J.; WIKSTROM, N.; HOLLINGSWORTH, P. M.; DUFF, R. J.; HOOT, S. B.; COWAN, R. S.; CHASE, M. W.; WILKINSON, M. J. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 159, p. 1–11, 2009.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949. p. 217.

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of Southern Brazil. **Biochemical Genetics**, v. 44, p. 479–490, 2006.

FREELAND, J. R. **Molecular ecology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2005. 388 p.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochimie normale et pathologique**. Gauthier-Paris: Villars, 1969–1970. 2 v. 1396 p.

GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C. B. V.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R.; TOMASINI, T. **Fitoterápicos**. Campinas: André Torsello, 1996. 17 p.

GE, X. J.; SUN, M. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 2061–2069, 1999.

GE, S. J.; LI, G. M.; MA, Z. Y.; WU, X. Y.; MENG, Y. J.; HUO, Y. Q. Analysis on genetic diversity of wild populations of Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) with AFLP markers. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 42, p. 47–54, 2009.

GEPTS, P.; BLISS, F. A. F₁ hybrid weakness in the common bean. **Journal of Heredity**, v. 76, p. 447–450, 1985.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; VAN DER BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 52–61, 2005.

GOBERT, V.; MOJA, S.; TABERLET, P.; WINK, M. Heterogeneity of three molecular data partition phylogenies of mints related to *M. x piperita* (*Mentha*; Lamiaceae). **Plant Biology**, v. 8, p. 470–485, 2006.

GODWIN, I. D.; AITKEN, E. A.; SMITH, L. W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, v. 18, p. 1524–1528, 1997.

GRATIVOL, C.; MEDEIROS, C. F. L.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accession. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 4245–4256, 2011.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2010. p. 13–25.

GUO, B. L.; LIN, S.; FENG, Y. X.; ZHAO, Y. J. Primary research on genetic relationship among main populations of *Salvia miltiorrhiza* and genuineness of herb. **Zhongcaoyào**, v. 33, p. 1113–1116, 2002.

GUPTA, V. S.; RAMAKRISHNA, W.; RAWAT, S. R.; RANJEKAR, P. K. (CAC)5 detects DNA fingerprinting and sequence homologous to gene transcripts in rice. **Biochemical Genetics**, v. 32, p. 1–8, 1994.

HARLEY, R. M.; ATKINS, S.; BUDANTSEV, A. L.; CANTINO, P. D.; CONN, B. J.; GRAYER, R.; HARLEY, M. M.; KOK, R.; KRESTOVSKAJA, T.; MORALES, R.; PATON, A. J.; RYDING, O.; UPSON, T. Labiatae. In: KADEREIT, J. W.; KUBITZKI, K. (Eds.). **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer, 2004. v. 7. 478 p.

HARLEY, R.; FRANÇA, F.; SANTOS, E. P.; SANTOS, J. S.; PASTORE, J. F. Lamiaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8296>>. Acesso em: 22/11/2013.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DE WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 207, p. 313–321, 2003.

HEINRICH, M. Economic botany of American Labiatae. In: HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. (Eds.). **Advances in Labiatae Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 475–488.

HEYWOOD, V. H.; IRIONDO, J. M. Plant conservation: old problems, new perspectives. **Biological Conservation**, v. 113, p. 321–335, 2003.

HOSSEINZADEH, H.; HADDAKHODAPARAST, M. H.; ARASH, A. R. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Salvia leriifolia* Benth. seed extract in mice and rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 422–425, 2003.

HONG, B. G.; BAO, R. L.; QIAN, H. W.; JIA, K. C.; TONG, S. Z. Abundant genetic diversity in cultivated *Codonopsis pilosula* populations revealed by RAPD polymorphisms. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p. 917–924, 2007.

INCT. Herbário Virtual da Flora e dos Fungos. Disponível em: <<http://inct.splink.org.br>>. Acesso em: 28/03/2014.

JAVAN, Z. S.; RAHMANI, F.; HEIDARI, R. Assessment of genetic variation of genus *Salvia* by RAPD and ISSR markers. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, p. 1068–1073, 2012.

JBRJ. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Jabot - Banco de Dados da Flora Brasileira. Disponível em: <<http://www.jbrj.gov.br/jabot>>. Acesso em: 28/03/2014.

JIMENA, E. S.; FRANÇA, F.; SOBRAL, M. Lamiaceae. In: STEHMANN, J. R.; FORZZA, R. C.; SALINO, S.; SOBRAL, M.; COSTA, D. P.; KAMINO, L. H. Y. (Eds.). **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. p. 297–303.

JIMENEZ, J.; RISCO, S.; RUIZ, T.; ZARZUELO, A. Hypoglycemic activity of *Salvia lavandulifolia*. **Planta Medica**, v. 52, p. 260–262, 1986.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.

KAMATOUA, G. P. P.; VILIOEN, A. M.; GONOBWALYA, A. B.; VAN ZYL, R. L.; VAN-VUUREN, S. F.; LOURENS, A. C. U.; BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B.; LINDSEY, K. L.; VAN STADEN, J.; STEENKAMP, P. The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three South Brazil *Salvia* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 382–390, 2005.

KASSUYA, C. A. L.; WISNIEWSKI-JÚNIOR, A.; SIMIONATTO, E. L.; SANTOS, E. P.; STEFANELLO, M. E. A. Composição dos óleos essenciais de *Salvia lachnostachys* e *Salvia melissiflora* (Lamiaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 919–921, 2009.

KOCHIEVA, E. Z.; RYZHOVA, N. N.; LEGKOBIT, M. P.; KHADEEVA, N. V. RAPD and ISSR analyses of species and populations of the genus *Stachys*. **Genetika**, v. 42, p. 887–892, 2006.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997. 198 p.

KRESS, W. J.; WURDACK, K. J.; ZIMMER, E. A.; WEIGT, L. A.; JANZEN, D. H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **PNAS**, v. 102, p. 8369–8374, 2005.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. A two locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **PLos One**, v. 2, e508, 2007.

KRUSKAL, J. B. Nonmetric multidimensional scaling: a numeral method. **Psychometrika**, v. 29, p. 115–129, 1964.

KURANE, J.; SHINDE, V.; HARSULKAR, A. Application of ISSR marker in pharmacognosy: current update. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, p. 216–228, 2009.

LARRAÑAGA, D. A. **Escritos de Don Dómaso Antonio Larrañaga**. Montevideu: Imprenta Nacional, 1923. v. 2. p. 11–12.

LAHAYE, R.; VAN DER BANK, M.; BOGARIN, D.; WARNER, J.; PUPULIN, F.; GIGOT, G.; MAURIN, O.; DUTHOIT, S.; BARRACLOUGH, T. G.; SAVOLAINEN, Y. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 105, p. 2923–2928, 2008.

LAZAR, I.; LAZAR, I. Gel Analyzer 2010a: freeware 1D gel electrophoresis image analysis software 2010. Disponível em: <www.gelanalyzer.com>. Acesso em: 10/09/2012.

LEMES, G. F.; FERRI, P. H.; LOPES, M. N. Constituintes químicos de *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R. Harley (Lamiaceae). **Química Nova**, v. 24, p. 39–42, 2011.

LEPORATTI, M. L.; PAVESI, A.; POSOCCO, E. Phytotherapy in the Valnerina (central Italy). **Journal Ethnopharmacology**, v. 14, p. 33–63, 1985.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Biodiversidade Brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. Campinas: Unicamp, 2000. 126 p. **Relatório Técnico Final do Ministério do Meio Ambiente**. 2000: versão internet. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira/itemlist/category/45-Biodiversidade-brasileira>>. Acesso em 03/09/2013.

LISTA de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 29/03/2014.

LI, H. S.; CHEN, G. Z. Genetic diversity of mangrove plant *Sonneratia caseolaris* in Hainan island based on ISSR analysis. **Acta Ecologica Sinica**, v. 24, p. 1656–1662, 2004.

LI, M.; CAO, H.; BUT, P. P. H.; SHAW, P. C. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 49, p. 271–283, 2011.

LÜDTKE, R.; AGOSTINI, G.; MIOTTO, S. T. S.; SOUZA-CHIES, T. T. Characterizing *Polygala* L. (Polygalaceae) species in Southern Brazil using ISSR. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 28, p. 317–323, 2010.

MAKLAD, Y. A.; ABOUTABLE, E. A.; EL-SHEREI, M. M.; MESELHY, K. M. Bioactivity studies of *Salvia transsylvanica* (Schur ex Griseb) grown in Egypt. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 147–150, 1999.

MANLY, B. F. J. **Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology**. London: Chapman & Hall, 1997.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F. C.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, p. 209–258, 2008.

MARTINI, K.; BIONDI, D.; BATISTA, A. C.; NATAL, C. M. Fenologia de espécies com potencial paisagístico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 75–84, 2010.

MAYER, B.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; SANTOS, C.; TWARDOWSCHY, A.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; MICKE, G. H.; HELLER, M.; SANTOS, E. P.; OTUKI, M. K.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective constituents of *Salvia officinallis* L. **Fitoterapia**, v. 80, p. 421–426, 2009.

McDERMOTT, J. M.; McDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 353–373, 1993.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1950. v. 1.

MORTON, T. **Atlas of medicinal plants of middle America, Bahamas to Yucatán**. Springfield: C. Thomas, 1981. 1420 p.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 70, p. 3321–3323, 1973.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 76, p. 5269–5273, 1979.

NEUHAUS, H.; LINK, G. The chloroplast tRNA (UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. **Current Genetics**, v. 11, p. 251–257, 1987.

NEWMASER, S. G.; FAZEKAS, A. J.; RAGUPATHY, S. DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. **Canadian Journal of Botany**, v. 84, p. 335–341, 2006.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2004. p. 371–400.

NOVOA, M. C.; MONTI, C.; VIZCAÍNO, C. E. Anatomía y etnobotánica de cuatro especies de Labiatae de la Provincia Biogeográfica Pampeana, usadas en la medicina popular. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 512–520, 2005.

NUÑEZ, D. R.; OBÓN DE CASTRO, C. The ethnobotany of old world Labiatae. In: HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. (Eds.). **Advances in Labiatae Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 455–473.

OLIVEIRA, H. B.; KFFURI, C. W.; CASALI, V. W. D. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in Rosário da Limeira, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 256–260, 2010.

OOSTERMEIJER, J. G. B.; LUIJTEN, S. H.; DEN NIJS, J. C. M. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. **Biological Conservation**, v. 113, p. 389–398, 2003.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288–295, 2006.

PETERSEN, M. Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1165–1172, 1997.

PICCINELLI, A. C.; IRIGUCHI, E. K. K.; SOUZA, A. V.; EHRENFRIED, C. A.; SANTOS, E. P.; STEFANELLO, M. E. A.; KASSUYA, C. A. L. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de *Salvia lachnostachys* (Lamiaceae) em camundongos. In: CONGRESSO IBEROAMERICANO DE FITOTERAPIA, 3., 2012, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Fitoterapia, 2012.

PINTO, P. S. **Terpenóides em espécies do gênero *Salvia* (Lamiaceae)**. 66 f. Dissertação (Mestre Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of populations structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959, 2000.

QUINTAS, A. T. Novo material de apoio para cortes histológicos. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade do Rio Grande do Sul**, v. 6, p. 51–53, 1963.

RAHIMMALEK, M.; BAHREININEJAD, B.; KHORRAMI, M.; TABATABAEI, B. E. S. Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*, an endangered medicinal plant, as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Biochemical Genetics**, v. 47, p. 831–842, 2009.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355–364, 2007.

REIS, A.; BOEIRA, A. F.; DAMETTO, A.; SANCHES, A. C.; SOUZA, A. C. de; COUTINHO NETO, A. A.; NEVES, B. T.; LONGO, B. L.; BARCELLOS, C. S.; PERART, D.; FREITAS, D. M.; ZECH, D. F.; MATOS, E. de P. M. de; PANSEIRA, E. G.; MARCHIORETTO, L.; BILESKEI, M. K. S.; MACHADO, M. S. C.; HEINZ, M. K.; CURY, R. K.; SPULDARO, S. C.; QUEVEDO, T. C. de; ZANOTTO, T. L.; SOBOLESKEI, V. F. Lista das espécies vegetais catarinenses da divisão Angiospermas. **Sellowia**, n. 56/63, p. 9–256, 2011.

REFLORA. Plantas do Brasil: resgate histórico e herbário virtual para o conhecimento e conservação da flora do Brasil. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 28/03/2014.

RICHARDSON, P. M. The chemistry of the Labiatae: an introduction and overview. In: HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. (Eds.). **Advances in Labiatae Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 291–297.

RODRÍGUEZ-HAHN, L.; ESQUIVEL, B.; CÁRDENAS, J.; RAMAMOORTHY, T. P. The distribution of diterpenoids in *Salvia*. In: HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. (Eds.). **Advances in Labiatae Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 335–347.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 33–36, 1972.

ROGSTAD, S. H. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. **Taxon**, v. 41, p. 701–708, 1992.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. New York: Exeter Publishing, 2000.

RUDALL, P. Leaf and twig anatomy of *Eriope*, a xeromorphic genus of Labiatae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 78, p. 157–180, 1979.

SALAZAR, G. A.; CHASE, M. W.; ARENAS, M. A. S.; INGROUILLE, M. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 90, p. 777–795, 2003.

SARASWAT, B.; VISEN, P. K. S.; DAYAL, R.; AGARWALL, D. P.; PATNAIK, G. K. Protective action of ursolic acid against chemical induced hepato-toxicity in rats. **Indian Journal Pharmacology**, v. 28, p. 232–239, 1996.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College, 1951. p. 98.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2004. p. 371–400.

SCHULTES, R. E. Ethnopharmacological conservation: a key to progress in medicine. **Acta Botanica**, v. 18, p. 393–406, 1988.

SCOTLAND, R.; HUGHES, C.; BAILEY, D.; WORTLEY, A. The big machine and the much-maligned taxonomist. **Systematics and Biodiversity**, v. 1, p. 139–143, 2003.

SEBERG, O.; HUMPHRIES, C. J.; KNOPP, S.; STEVENSON, D. W. M.; PETERSEN, G.; SCHARFF, N.; ANDERSEN, N. M. Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p. 63–65, 2003.

SERRATO-VALENTI, G.; BISIO, A.; CORNARA, L.; CIARALLO, G. Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of the *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. **Annals of Botany**, v. 79, p. 329–336, 1997.

SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**, v. 27, p. 379–423, 1948a.

SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**, v. 27, p. 623–656, 1948b.

SINGH, V.; SHARMA, M.; JAIN, D. K. Trichomes in *Salvia* (Labiatae) and their taxonomic significance. **Bulletin of the Botanical Survey of India**, v. 16, p. 27–34, 1974.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman, 1972. p. 230–234.

SOBRAL, M.; STEHMANN, J. R. An analysis of new angiosperm species discoveries in Brazil (1990–2006). **Taxon**, v. 58, p. 227–232, 2009.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; DOYLE, J. J. (Eds.) **Molecular Systematics of Plants II**: DNA sequencing. New York: Springer Science & Business Media, 1998. p. 1–42.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2004. p. 289–326.

SONG, Z.; LI, X.; WANG, H.; WANG, J. Genetic diversity and population structure of *Salvia miltiorrhiza* Bge in China revealed by ISSR and SRAP. **Genetica**, v. 138, p. 241–249, 2010.

SOUZA, W. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007. 357 p.

SOUZA, I. G. B.; SOUZA, V. A. B.; LIMA, P. S. C. Molecular characterization of *Platonia insignis* Mart. (“Bacurizeiro”) using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Biology Research**, v. 40, p. 3835–3845, 2013.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, v. 5, p. 233–241, 1996.

STEARN, W. T. **Botanical latin**. 3 ed. Great Britain: Redwood Press, 1983.

SWOFFORD, D. L. **PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony** (*and others methods). Version 4b10. Sunderland: Sinauer Associates, 2003.

TADDEI, I.; GIACHETTI, D.; TADDEI, E.; MANTOVANI, P. Spasmolytic activity of peppermint, sage and rosemary essences and their major constituents. **Fitoterapia**, v. 59, p. 463–468, 1988.

TIVANG, J. G.; NIENHUIS, J.; SMITH, O. S. Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 259–264, 1994.

TOKUDA, H.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K.; ITO, I. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Letter**, v. 33, p. 279–285, 1986.

VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. DNA barcoding for ecologists. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 24, p. 110–117, 2008.

VALVERDÚ, C.; VILA, R.; LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; VILLAMIL, J.; TOMI, F.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. Composition of the essential oil of cultivated *Salvia guaranitica* from Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 421–424, 2005.

VAN TREUREN, R.; BIJLSMA, R.; OUBORG, N. J.; VAN DELBEN, W. The effects of population size and plant density on outcrossing rates in locally endangered *Salvia pratensis*. **Evolution**, v. 47, p. 1094–1104, 1993.

VIJAYAN, K.; TSOU, C. H. DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. **Current Science**, v. 99, p. 1530–1541, 2010.

VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; MARDER, M.; WOLFMAN, C.; PALADINI, A. C.; MEDINA, J. A. Sedative and hypnotic properties of *Salvia guaranitica* St. Hill and of its active principle, Cirsiolol. **Phytomedicine**, v. 4, p. 47–51, 1997.

XUE, H.; XIAO, Y.; JIN, Y.; LI, X.; FANG, Y.; ZHAO, H.; ZHAO, Y.; GUAN, J. Genetic diversity and geographic differentiation analysis of duckweed using inter-simple sequence repeat markers. **Molecular Biology Research**, v. 39, p. 547–554, 2012.

WALKER, J. B.; SYTSMA, K. J.; TREUTLEIN, J.; WINK, M. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 1115–1125, 2004.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239–254, 1996.

WANG, J. Application of the one migrant per generation rule of conservation and management. **Conservation Biology**, v. 18, p. 332–343, 2004.

WANG, B.; ZHANG, Y.; CHEN, C. B.; LI, X. L.; CHEN, R. Y.; CHEN, L. Analysis on genetic diversity of different *Salvia miltiorrhiza* geographical populations in China. **Zhongguo Zhong Yao Zazhi**, v. 32, p. 1988–1991, 2007.

WANG, Q.; ZHANG, B.; LU, Q. Conserved region amplification polymorphism (CoRAP), a novel marker technique for plant genotyping in *Salvia miltiorrhiza*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 27, p. 139–143, 2009.

WANG, M.; LI, J.; ZHANG, L.; YANG, R. W.; DING, C. B.; ZHOU, Y. H.; YIN, Z. Q. Genetic diversity among *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related species using morphological traits and RAPD markers. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 2687–2694, 2011.

WANG, H. F.; ZONG, X. X.; GUON, J. P.; YANG, T.; SUN, X. L.; MA, Y.; REDDEN, R. Genetic diversity and relationship of global faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm revealed by ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, p.789–797, 2012.

WANG, M.; ZHAO, H.; WANG, L.; WANG, T.; YANG, R.; WANG, X.; ZHOU, Y.; DING, C.; ZHANG, L. Potential use of DNA barcoding for the identification of *Salvia* based on cpDNA and nrDNA sequences. **Gene**, v. 528, p. 206–215, 2013.

WESTER, P.; CLAßEN-BOCKHOFF, R. Bird pollination in South African *Salvia* species. **Flora**, v. 201, p. 396–406, 2006.

WESTER, P.; CLAßEN-BOCKHOFF, R. Floral diversity and pollen transfer mechanisms in bird-pollinated *Salvia* species. **Annals of Botany**, v. 100, p. 401–421, 2007.

WU, Y. C.; GUO, Q. S.; HE, J. C.; LIN, Y. F.; LUO, L. J.; LIU, G. D. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 63–72, 2010.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **PoPgene version 1.31**: Microsoft window-based freeware for population genetic analysis, 1999. Disponível em: < <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf> >. Acesso em: 10/01/2012.

YU, J.; XUE, J. H.; ZHOU, S. L. New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 49, p. 176–181, 2011.

ZHANG, Y.; DENG, K.; XIE, L.; LI, X.; WANG, B.; CHEN, L. Genetic diversity analysis and conservation of the Chinese herb *Salvia miltiorrhiza* collected from different geographic origins in China. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 4849–4855, 2009.

ZHANG, Y.; LI, X.; WANG, Z. Diversity evaluation of *Salvia miltiorrhiza* using ISSR markers. **Biochemical Genetics**, v. 51, p. 707–721, 2013.

ZHAO, Y.; CHEN, X. Y.; WANG, X. R.; PIAN, R. Q. ISSR analysis of genetic diversity among *Lespedeza bicolor* populations. **Journal of Plant Genetic Resources**, v. 2, p. 195–199, 2007a.

ZHAO, W.; ZHOW, Z.; MIAO, X.; ZHANG, Y.; WANG, S.; HUANG, J.; XIANG, H.; PAN, Y.; HUANG, Y. A comparison of genetic variation among wild and cultivated *Morus* species (Moraceae: *Morus*) as revealed by ISSR and SSR markers. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 275–290, 2007b.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) –anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176–183, 1994.

ZURAWSKI, G.; PERROT, B.; BOTTOMLEY, W.; WHITFELD, P. R. The structure of the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 9, p. 3251–3269, 1981.

ANEXO

ANEXO 1 - ARTIGO PUBLICADO NA <i>MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE</i> (2012)	93
-----------------------------------------------------------------------------------------	----

ANEXO 1 - ARTIGO PUBLICADO NA MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE (2012)

MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE 00:000–000 (2012)

Morphoanatomical and Phytochemical Studies of *Salvia lachnostachys* (Lamiaceae)MARIANNA ERBANO,¹ CARLOS AUGUSTO EHRENFRIED,² MARIA ÉLIDA ALVES STEFANELLO,² AND ÉLIDE PEREIRA DOS SANTOS^{1*}¹Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19031, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil²Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 81.530-900, Curitiba, Paraná, Brazil**KEY WORDS** fruticuline A; glandular-trichomes; Labiatae; oleanolic acid
SEM; TLC; ursolic acid

ABSTRACT *Salvia lachnostachys* Benth., Lamiaceae, is a endemic species from southern Brazil. The essential oil of its leaves and flowers is mainly constituted by aliphatic compounds, such as dodecanoic acid, with sesquiterpenes as minor constituents. This work evaluated the morphology, anatomy, microchemistry, and phytochemistry of *S. lachnostachys* to provide advanced knowledge of Brazilian plants with medicinal potential. Light and scanning electron microscopy techniques were used in the anatomical and microchemical studies. Compounds were isolated by chromatographic techniques, identified by analysis of their NMR spectra and compared with published data. *S. lachnostachys* can be distinguished from other related species mainly by its petiole leaves, terminal inflorescence, persistent bracts, and villous-glandular corolla. The stem and leaves of *S. lachnostachys* display anatomical characteristics common to the family Lamiaceae. However, this species can be distinguished from other family members by the morphology and the presence of eglandular and glandular trichomes, as well as the organization of the vascular bundles of the petiole. The phytochemical results revealed that *S. lachnostachys* produces oleanolic and ursolic acids in addition to the diterpene fruticuline A, which is a rare compound, previously found only in *Salvia fruticulosa* Benth. and *S. corrugata* Vahl. Ursolic and oleanolic acids are bioactive triterpenes that exhibit antiatherosclerotic, anticancer, antihypertensive, antiinflammatory, antileukemic, antimutagenic, antioxidant, antiproliferative, and antiviral activities, and fruticuline A has antibacterial activity. *Microsc. Res. Tech.* 00:000–000, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

Brazil has some of the highest plant diversity of the world. However, only 8% of its native species have been studied for the purpose of identifying bioactive compounds (Guerra and Nodari, 2010). The search for new drugs has stimulated research on native species, especially on genera that are used in traditional medicine.

The genus *Salvia* L. is the largest in the family Lamiaceae, with ~900 species found in areas with subtropical and temperate climates. The infrageneric classification is outdated, although the neotropical subgenera *Calosphace* Benth. and *Aldibertia* (Benth.) Epling appear to be monophyletic (Harley et al., 2004).

Some species of *Salvia* are used in folk medicine, such as *Salvia officinalis* L., which is native to the Mediterranean region but is cultivated in Brazil and used as an antidiabetic treatment (Bailey and Day, 1989). The representatives of this genus present pharmacological activities, such as antiinflammatory, contraceptive (Hosseinzadeh et al., 2003), antibacterial (Darias et al., 2006), gastroprotective (Mayer et al., 2009), antiplatelet, and antithrombotic properties (Fan et al., 2010). Although 61 species of *Salvia* occur in Brazil (Harley et al., 2010), there are few pharmacognostic or chemical studies of Brazilian *Salvia* species.

Salvia lachnostachys Benth. is endemic to the fields of southern Brazil (Harley et al., 2010; Jimena et al.,

2009), and the chemical constituents of the essential oil of its leaves and flowers are mainly long-chain aliphatic acids, with sesquiterpenes as minor constituents (Kassuya et al., 2009). Terpenoids, which are characteristic compounds of the family, have antibacterial and antifungal activities (Harley et al., 2004; Richardson, 1992).

The present work describes, for the first time, the morphoanatomical study and the isolation of terpenoids of *S. lachnostachys*, a potential medicinal plant from Brazil.

MATERIALS AND METHODS**Plant Material**

The plant material was collected in the natural habitat in the steep vegetation in Curitiba, Paraná state, Brazil (25°30'44.6"S, 49°18'7.13"W, 932 m above sea level), by E.P. Santos (number 1251).

Part of the material was separated for phytochemical studies, and a voucher was included in the herbaria UPCH (Herbarium of the Federal University of Paraná).

The remaining material, including mature leaves and young stem fragments, was fixed in a solution of

*Correspondence to: Élide Pereira dos Santos, Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19031, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil. E-mail: elide@ufpr.br

Received 5 July 2012; accepted in revised form 16 August 2012

Contract grant sponsors: CNPq, Reuni/CAPES

DOI 10.1002/jemt.22125

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

formalin:acetic acid:alcohol (FAA; 1:1:18, 70% ethanol, v/v) and stored in 70% ethanol.

Macroscopic Analysis

The plant dimensions were established through measuring the footage with a digital caliper (CD-15CX, Mitutoyo, Japan) and analyzed with a magnifying glass (MZ6, Leica, Germany). The terms used in the macroscopic description was based on Stearn (1983), Wood and Harley (1989), Harley et al. (2004), and Santos (2004).

Microscopic Analysis

The median region of the leaves was transversally sectioned in the midrib and the petiole. The stem was sectioned transversally.

The sections were stained either with astra blue and basic fuchsin or with toluidine blue and mounted on semipermanent slides with glycerin gelatin.

The material previously fixed in FAA 70 was dehydrated in an ethanol series (80, 95% v/v), embedded in synthetic resin (Historesin, Leica, Germany), sectioned with a rotary microtome (CUT 4055, Olympus, Japan), stained with toluidine blue and mounted on permanent slides.

The fresh or fixed material was used to the test for the presence or absence of lipids, phenolic compounds, lignin, terpenoids with a carbonyl group, and starch.

Specimens were observed and photographed with photonic microscopy (BX40, Olympus, Japan).

The ultrastructural analysis of the leaf and the stem surface, using scanning electron microscopy, was performed with samples fixed in FAA 70. The studied material was dehydrated in an increasing ethanol series (80, 90, and 100% v/v) and then, in a critical point dryer in CO₂ (CPD-030, Bal-Tec, Germany), coated with gold in the sputter (SCD-030, Balzers, Germany). Observations and digital photographs were taken with a scanning electron microscope (JSM 6360LV, JEOL, Japan).

The anatomical analysis was based on Metcalfe and Chalk (1950).

Phytochemical Study

General Procedures. NMR spectra were recorded on Bruker AC 200 and/or Avance 400 spectrometer, observing ¹H at 200 or 400 MHz and ¹³C at 50 or 100 MHz, respectively. The solvents used were CDCl₃ and/or MeOH-D₄, with TMS as internal reference. Silica gel (Merck, 230–400 mesh) was used for column chromatography (CC) and vacuum liquid chromatography (VLC), while silica gel 60 PF₂₅₄ (Merck) was used for analytical (0.25 mm) and preparative (1.0 mm) thin-layer chromatography (TLC). Compounds were visualized by UV_{254/366} exposure and by spraying with 5% (v/v) H₂SO₄ in EtOH solution followed by heating on a hot plate.

Extraction and Isolation. Dried and powdered leaves of *S. lachnostachys* (481.8 g) were extracted with hexane (3 × 1.5 L) followed by ethanol (3 × 1.5 L). The solvents were removed under reduced pressure to give the crude extracts in hexane (14.4 g) and ethanol (17.9 g). Part of the ethanol extract (8.9 g) was submitted to silica gel VLC eluted with CH₂Cl₂, mixtures of CH₂Cl₂-MeOH (99:1, 9:1, and 1:1) and pure MeOH (300 mL, each solvent), yielding five fractions (I–V).

Fraction I (2.37 g), eluted with CH₂Cl₂, was submitted to silica gel CC eluted with hexane, mixtures of hexane-CH₂Cl₂ (1:1, 2:3, 3:7, and 1:9), pure CH₂Cl₂, mixtures of CH₂Cl₂-MeOH (9:1 and 1:1) and pure MeOH. After TLC analysis, 14 subfractions were obtained. Subfraction I-10 (190.7 mg), eluted with hexane-CH₂Cl₂ 1:9, yielded 1 (50.8 mg) after recrystallization in petroleum ether. Fractions II (0.46 g), III (2.46 g), IV (0.98 g), and V (0.58 g) were similar by TLC analysis. Fraction III was submitted to silica gel CC and eluted with hexane, mixtures of hexane-acetone (9:1, 1:1, and 7:3), pure acetone and pure methanol, yielding 18 subfractions after TLC analysis. Subfraction III-15 (30.1 mg), eluted with hexane:acetone 7:3, yielded 2 + 3. These compounds were also found in the remaining subfractions together with small amounts of other triterpenes that could not be isolated.

RESULTS

Macroscopic Description

S. lachnostachys Benth., Labiat. Gen. Sp. 267 (1833).

Perennial herb, decumbent with ascending branches, rooting at the nodes, with pubescent-glandular stems. Leaves petiolate (petiole 0.3–1.6 mm long); leaf lamina (0.7–5.4 × 0.2–2.5 cm), narrowly ovate, craspedromous venation, colliculate surface, margin crenate, base rounded, apex obtuse, the upper surface pubescent-glandular, the lower tomentose-glandular. Inflorescence terminal (2.5–27 cm long), villous-glandular, with 7–17 verticils; verticils 8–14-flowered, bracts (5–8 × 4.5–7 mm) persistent, sessile, ovate, villous-glandular; pedicels 0.1–0.6 mm long, villous-glandular. Calyx 6–8 mm long in flower, elongating to 7–9 in fruit, villous-glandular; upper lip 2.5–3 mm long, entire, obtuse, 7-nerved; lower lip 2–2.3 mm long with two obtuse teeth 1.7–2 mm long, 7-nerved. Corolla blue, 9.5–13 mm long from base to apex of upper lip, from base to lower lip 13.5–18 mm long, villous-glandular. Corolla tube 6.5–9 mm long, upper lip 3–4 mm long; lower lip 7–9 mm long. Stamens two, attached at the throat, fertile thecae enclosed within the upper lip; fertile thecae about 1.5 mm long, oblong; sterile thecae c. 1 mm long; filament c. 1.5 mm long; connective c. 4.5 mm long. Staminodes 0.7–0.8 mm long, attached at the upper three-fourth of the tube. Style 9 mm long, villous at the upper one-third of the base; upper stigma lobe longer than the lower, the upper 2.5 mm long, the lower 0.5 mm long. Nutlets 3–4 mm long, oblong (Fig. 1).

Microscopic Analysis

Stem. *S. lachnostachys* has a quadrangular stem in transverse section (Fig. 2A). The epidermis is uniseriate (Fig. 2B), composed of polygonal cells in the front view with a striate cuticle (Figs. 2E and 2F). The following three types of trichomes have been observed: (a) eglandular uniseriate filiform, composed of 1–2 cells or up to 7 cells that may or may not have epicuticular ornamentation; (b) peltate glandular trichome, consisting of a base cell, a short stalk cell, and a multicellular round secretory head; and (c) capitate glandular trichome, comprised of a short unicellular stalk and a 1- to 2-celled secretory head or a long 2- to 4-celled stalk and a unicellular head (Figs. 2E and 2F).

In the cortex, there are 1–4 layers of collenchyma cells of the annular type (Fig. 2B), mainly in the corners, and 2–4 layers of parenchymatic cells, principally between

M.L.B.

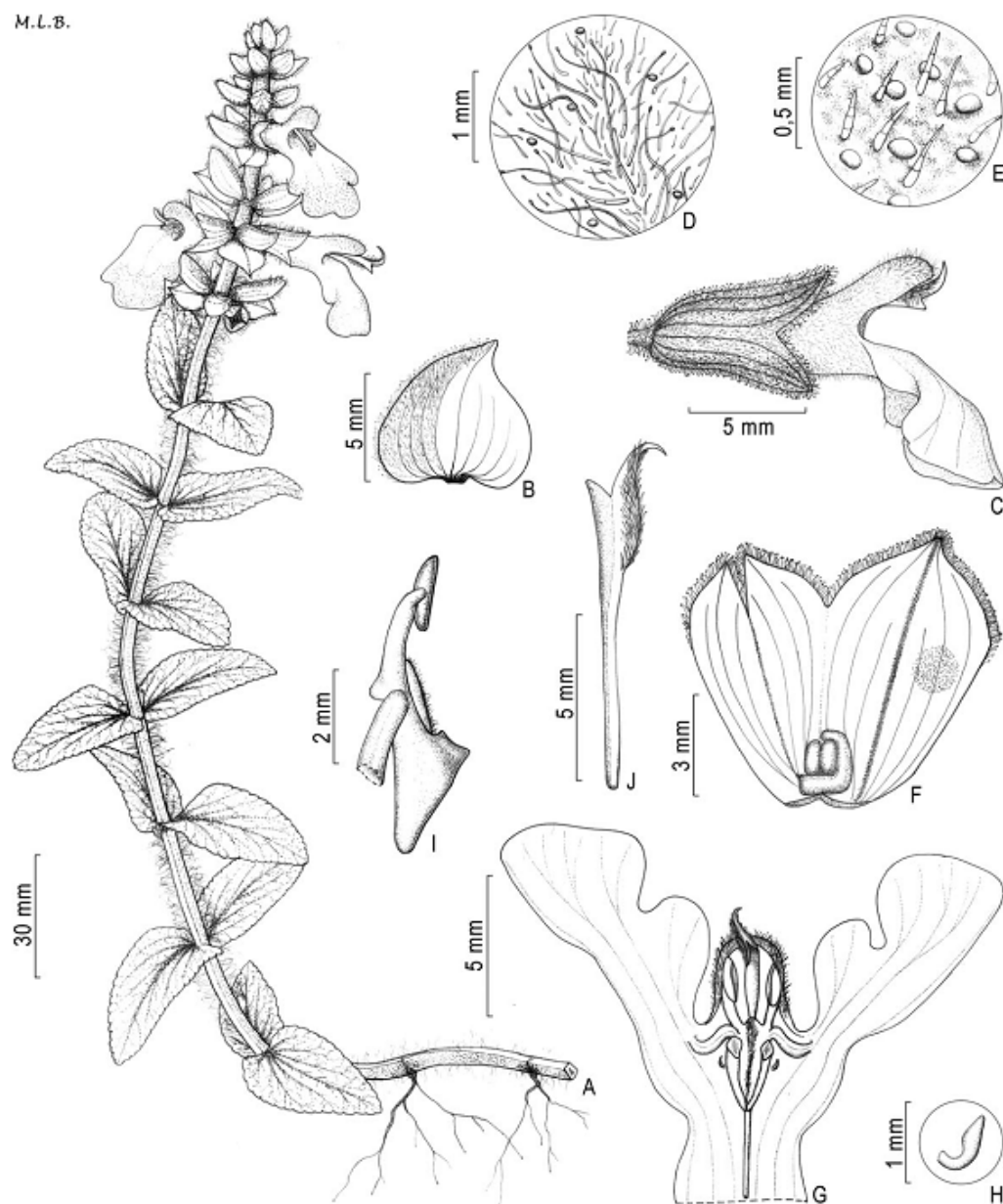


Fig. 1. *Salvia lachnostachys* Benth., Lamiaceae: (A) habit; (B) bracts; (C) flower; (D) detail from calyx indumentum; (E) detail from corolla indumentum; (F) calyx, opened to show ovary; (G) corolla, opened to show stamens and staminodes; (H) staminate; (I) stamens, without filament; and (J) style. All drawn from E.P. Santos & M. Erhano 1251 (UPCB) by Marcelo L. Brotto.

the corners (Fig. 2A). The vascular system is surrounded by a discontinuous sclerenchymatic sheath of 2–3 layers, mostly in the corners (Figs. 2A and 2C). The size and quantity of the vascular bundles at the corners are larger than that of the bundles between corners (Figs. 2A and 2D). The pith cells are comparatively larger than the other cells in the stem, are oval type and form a moderately lignified wall (Fig. 2A).

Leaf. The lamina, in the surface view, has epidermal cells with polygonal contours covered by a striate cuticle (Figs. 3A and 3B). Diacytic stomata (Fig. 3A) are present on both surfaces. These epidermal appendages have external cuticle ledges on the lamina, predominantly on the abaxial surface. There are eglandular and capitate glandular trichomes similar to those on the stem on both surfa-

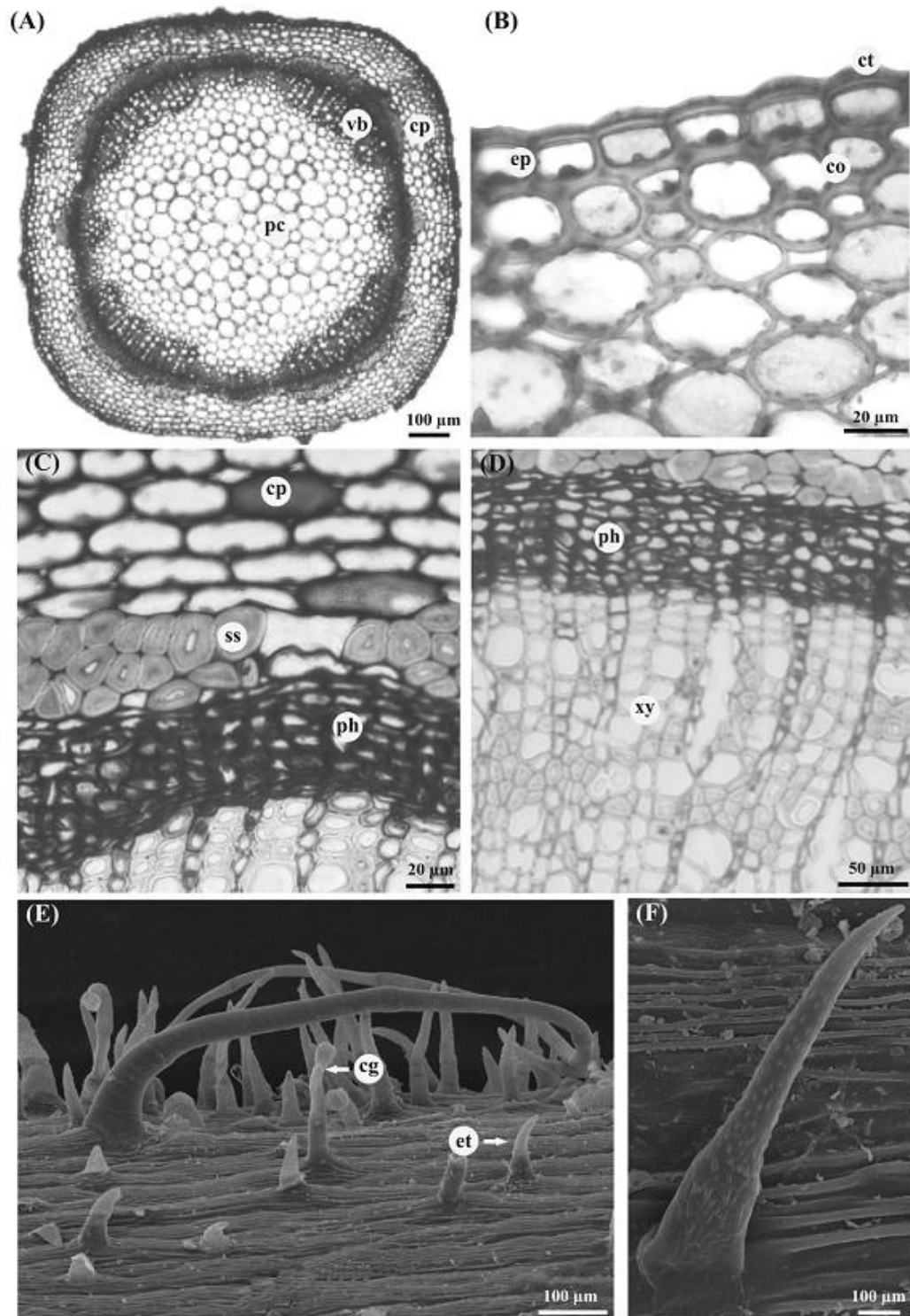


Fig. 2. *Salvia lachnostachys* Benth., Lamiaceae. Stem: (A) overall appearance, in transverse section; (B) detail of the epidermis and collenchyma; (C) detail of the cortical parenchyma, sclerenchymatic sheath, and phloem; (D) detail of the vascular cylinder; (E) a surface view of the eglandular and glandular trichomes; and (F)

eglandular trichome with epicuticular ornamentation. Abbreviations: co, collenchyma; cp, cortical parenchyma; ct, cuticle; ep, epidermis; et, eglandular trichome; pc, pith cells; pg, peltate glandular trichome; ph, phloem; ss, sclerenchymatic sheath; vb, vascular bundle; xy, xylem.

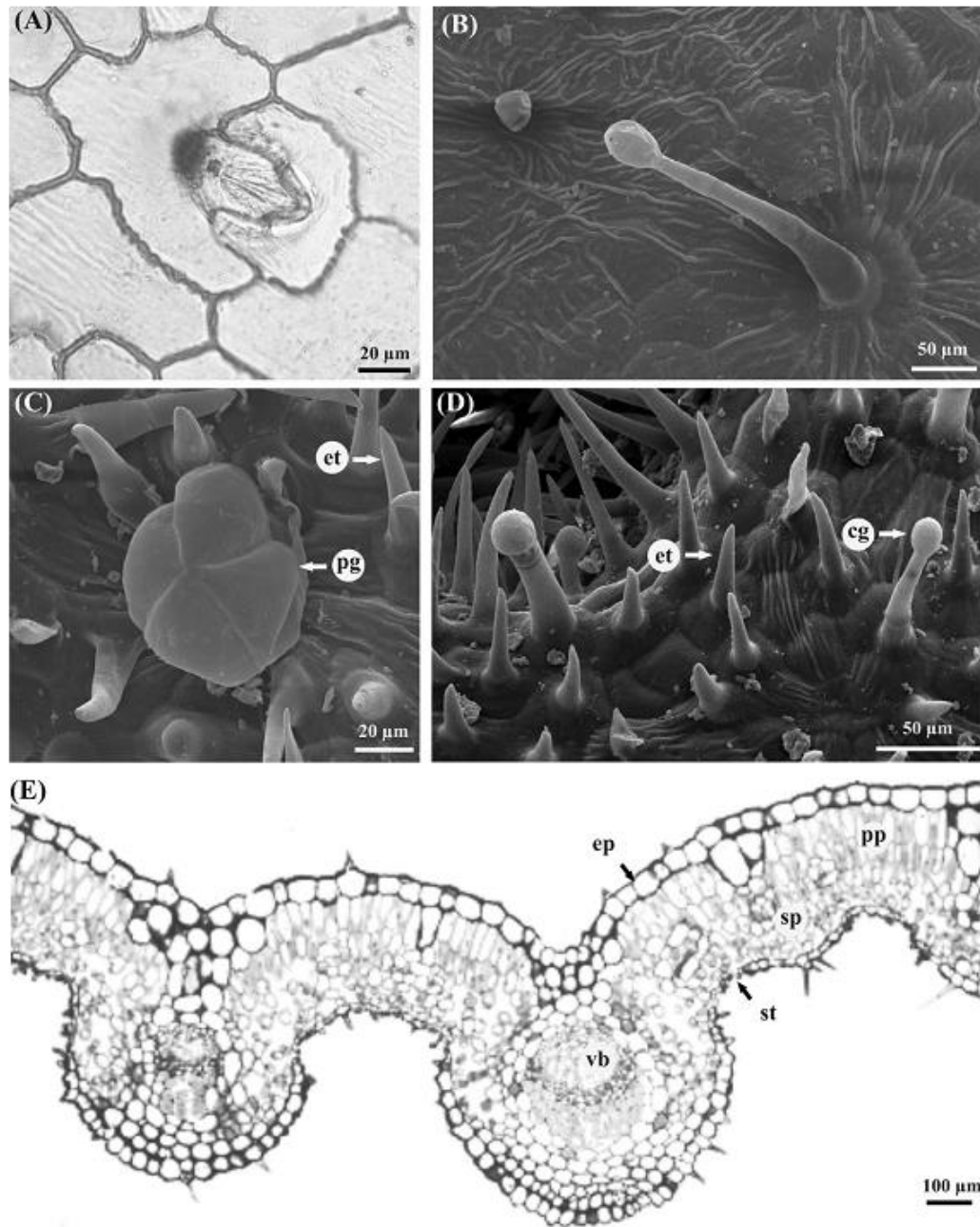


Fig. 3. *Salvia lachnostachys* Benth., Lamiaceae. Leaf: (A) adaxial epidermal cells, in surface view; (B) glandular trichomes, in adaxial surface view; (C, D) eglandular and glandular trichomes, in abaxial surface view; and (E) median region of the leaves transverse sectioned in the midrib. Abbreviations: cg, capitate glandular; ep, epidermis; et, eglandular trichome; pg, peltate glandular trichome; pp, palisade parenchyma; sp, spongy parenchyma; st, stomatum; vb, vascular bundle.

ces; however, there are many more trichomes on the abaxial surface (Figs. 3B–3D). The peltate glandular trichomes occur only in the abaxial surface (Fig. 3C).

Leaf blades are bifacial, amphistomatic, and covered by a uniseriate epidermis with cells that are generally larger on the adaxial surface. The stomata are normally located at the same level as the other epidermal

cells (Fig. 3E). The mesophyll consists of a two-layered palisade parenchyma and a scattered spongy parenchyma (Fig. 3E). The main vein has a concavo-convex contour, and 1–2 layers of annular lignified collenchymas were observed on subepidermal position on both surfaces (Figs. 3E, 4A, and 4B), in addition to two layers of parenchyma cells. The vascular bundle is collateral and is in the shape of an arc (Fig. 4C).

The petiole (Figs. 4D–4H) has nearly plain-convex contour in cross-section and a structure similar to the midrib. However, it has three vascular bundles: one higher in the center and two smaller ones in the corners (Fig. 4D).

Microchemical Analysis

Microchemical tests revealed the presence of lipids in the epidermis, mainly in the cuticle, stem, and leaf. The phenolic compounds were observed in peltate glandular trichomes, in some cells of the epidermis, the fundamental parenchyma and xylem of the stem and the mesophyll of the leaves. The presence of the lignin was confirmed in the sclerenchymatic sheath and the xylem of all parts of the plant. The terpenoids with a carbonyl group were detected in eglandulares and glandular trichomes, the xylem and sclerenchymatous sheath of the stem and petiole, epidermal cells, and mesophyll of the leaf.

Phytochemical Study

Compound **1** was isolated as a yellow solid that showed a single spot in the TLC analysis. Its ^1H NMR spectrum showed signals due to the presence of an isopropyl group (δ 1.26, d, 6H, J = 7.0 Hz and δ 3.37, septet, 1H, J = 7.0 Hz), a methyl group attached to an aromatic ring (δ 2.44, s, 3H), a methylene group (δ 3.10, d, 2H, J = 7.6) and a methoxyl group (δ 3.80, s, 3H). Also was observed five protons at lower field, being two doublets at δ 6.86 and 6.98 (J = 2.6), indicating a benzene 1,3,5,6-tetrasubstituted, a triplet at δ 6.96 (J = 7.6), a broad singlet at δ 7.68 and a singlet at δ 8.16. The ^{13}C and DEPT NMR spectra showed 19 peaks, corresponding to methyl and O-methyl groups (δ 19.5, 20.2, and 55.3), one methylene carbon (δ 28.3), one aliphatic (δ 24.9), and four aromatic methine carbons (δ 112.0, 121.4, 133.9, and 140.8) and, 10 quaternary carbons, including two carbonyl groups (δ 183.2 and 184). These data suggested a norditerpene type abietane. Analysis of one-bond and long-range ^1H - ^{13}C correlations from the HSQC and HMBC experiments, and comparison with literature (Bisio et al., 2008), led to identification of **1** as fruticuline A (Fig. 5).

Compounds **2** and **3** were isolated as a white solid and gave a single spot in the TLC analysis. The ^1H NMR spectrum showed a profile typical of triterpenes, exhibiting signals of several methyl groups (δ 0.77–1.15), methylene and methine protons (δ 0.7–2.8), oxymethine protons (δ 3.2, m) and olefinic protons (δ 5.25, m). In the ^{13}C NMR spectrum the presence of 54 peaks indicated a mixture of triterpenes. In particular were observed a signal of oxymethine carbon (δ 78.6), four signals of olefinic carbons, characteristic of triterpenes type olean-12-ene (δ 122.1 and 143.7) and urs-12-ene (δ 125.3 and 138.0) (Gallegos and Roque, 1990) and, two signals of carbonyl groups (δ 180.6 and 180.8). These data are compatible with the presence of triter-

pene acids. Analysis of correlations in the HSQC and HMBC experiments, as well as comparison with published data (Kontogianni et al., 2009; Seebacher et al., 2003) led to identification of oleanolic acid (**2**) and ursolic acid (**3**) (Fig. 5).

DISCUSSION

The morphological descriptions of *S. lachnostachys* available in the original diagnosis of the species (Bentham, 1834) and Epling's publications (1935, 1939) are extremely brief and do not present an illustration of the taxon. The detailed description and illustration presented in this study make it possible to correctly identify this species.

S. lachnostachys can be distinguished from others related species by the following morphological characters: decumbent to ascending herb, rooting at the nodes; leaves with petioles; terminal inflorescence with 7–17 verticils (8- to 14-flowered), persistent bracts and villous-glandular corolla.

Metcalfe and Chalk (1950) relate the morphoanatomical characteristics used to identify the family Lamiaceae, and the following were observed in *S. lachnostachys*: eglandular and glandular trichomes, a quadrangular stem in the transverse section, amphistomatic leaves, diacitic stomata, and bifacial mesophyll. These characteristics were also confirmed for *Salvia pallida* Benth. and *Salvia procurrens* Benth. (Novoa et al., 2005), which are closely related to *S. lachnostachys* and are included in the subgenus *Calosphaea* in the section *Uliginosae*.

Singh et al. (1974) analyzed the glandular trichomes of several species of *Salvia* and classified them into the following two types: peltate and capitate. The morphology and the presence or absence of these trichomes is used to distinguish species in this genus. According to Werker (1993), the glandular trichomes produce essential oils that most likely function as protection against herbivores and as attractants of pollinators. In the stems and leaves of *S. lachnostachys* both capitates and peltate trichomes are present, though they are more frequent on the abaxial surface. Peltate trichomes were also observed in *S. pallida* by Novoa et al. (2005).

The petiole of *S. procurrens* has two vascular bundles in the center, and *S. pallida* has one vascular bundle in the center and two auxiliary bundles laterally (Novoa et al., 2005), which is the same organization observed in *S. lachnostachys*.

The presence of essential oils mainly consisting of terpenoids, which may have antibacterial activity, and phenolic compounds is characteristic of the Lamiaceae species (Richardson, 1992). The essential oil of the *Salvia* species has been evaluated for antiinflammatory, antimicrobial (Kamatou et al., 2005), and antimicrobial (Sonboli et al., 2006) pharmacological properties. However, the essential oil of *S. lachnostachys* leaves is rich in aliphatic compounds, mainly dodecanoic acid, which represents 61.6% of total of the oil. The content of individual terpenes is lower than 3% (Kassuya et al., 2009).

The microchemical tests of *S. lachnostachys* indicated the presence of terpenic acids and phenolic compounds in the stems and leaves. The phytochemical study showed that this species produces oleanolic and ursolic acids (**2** and **3**), in addition to the diterpene fruticuline A (**1**). Compounds **2** and **3** are very common in

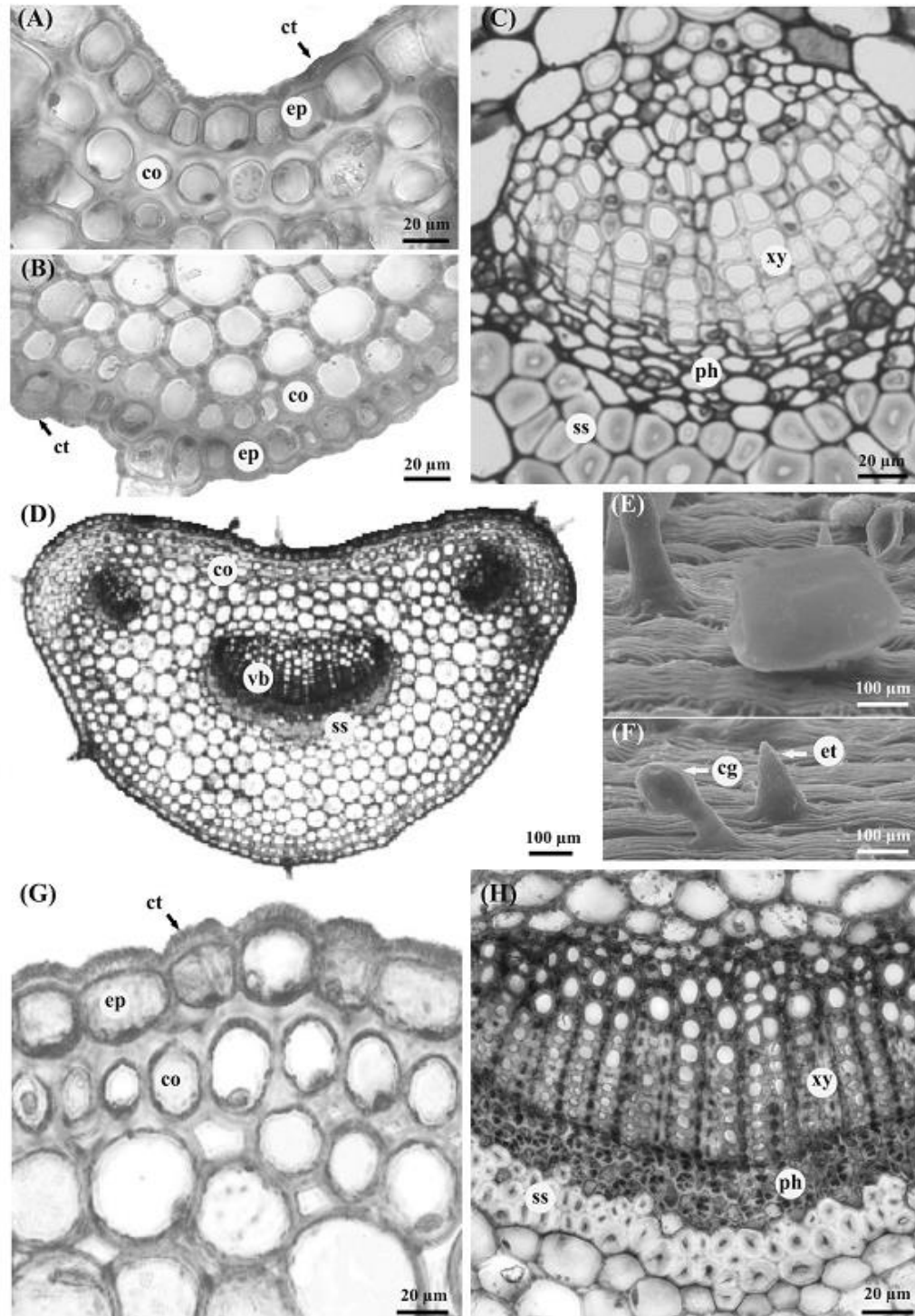


Fig. 4. *Salvia lachnostachys* Benth., Lamiaceae. Transverse section of the blade. (A) Midrib showing cuticle, epidermis, and collenchyma in the adaxial and (B) abaxial surfaces; (C) vascular bundle of the midrib; (D) petiole in transverse section; (E, F) surface view of the petiole showing eglandular and glandular trichomes; (G) details of

the cuticle, epidermis and collenchyma of the petiole; and (H) vascular bundle of the petiole. Abbreviations: cg, capitate glandular trichome; co, collenchyma; ct, cuticle; ep, epidermis; pg, peltate glandular trichome; ph, phloem; ss, sclerenchymatic sheath; vb, vascular bundle; xy, xylem.

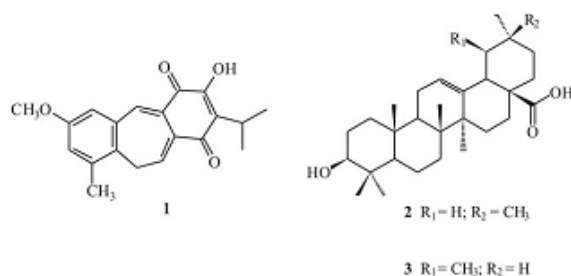


Fig. 5. Structures of isolated compounds of *Salvia lachnostachys* Benth., Lamiaceae.

nature and are found in several botanical families, including Lamiaceae (Janicsák et al., 2006; Topçú, 2006). On the other hand, **1** is a rare compound, previously isolated only from *Salvia fruticulosa* Benth. (Rodríguez-Hahn et al., 1989) and *Salvia corrugata* Vahl (Bisio et al., 2008), two American species belonging to the subgenus *Calosphace*. Our results corroborate earlier findings regarding the distribution of diterpenes in the *Calosphace* species (Rodríguez-Hahn et al., 1992). Oleanolic and ursolic acids exhibit several biological activities, such as antiatherosclerotic, anticancer, antihypertensive, antiinflammatory, antileukemic, antimutagenic, antioxidant, antiproliferative, and antiviral activities (Checker et al., 2012; Pollier and Goossens, 2012). Fruticuline A showed potent antibacterial activity (Bisio et al., 2008; Schito et al., 2011). Therefore, *S. lachnostachys* is a new source of compounds with important biological properties, although there are no reports of the use of this species in traditional medicine.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Centro de Microscopia Eletrônica of the Federal University of Paraná (UFPR) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy.

REFERENCES

- Bailey CE, Day C. 1989. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* 12:553–564.
- Bentham G. 1834. *Salvia*. In: Bentham G, editor. *Labiatarum genera et species*, J. Ridgeway & Sons: Picadilly, London. pp.190–314.
- Bisio A, Romussi G, Russo E, Cafaggi S, Schito AM, Repetto B, De Tommasi N. 2008. Antimicrobial activity of the ornamental species *Salvia corrugata*, a potential new crop for extractive purposes. *J Agr Food Chem* 56:10468–10472.
- Checker R, Sandur SK, Sharma D, Patwardhan RS, Jayakumar S, Kohli V, Sethi G, Aggarwal BB, Sainis KB. 2012. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. *PLoS ONE* 7:1318–1332.
- Darias V, Bravo L, Rabanal R, Sanchez-Mateo CC, Martin-Herrera DA. 2006. Cytostatic and antibacterial activity of some compounds isolated from several Lamiaceae species from the Canary Islands. *Planta Med* 55:70–72.
- Epling C. 1935. *Salvia*. *Repert Spec Nov Regni Veg* 85:27–130.
- Epling C. 1939. A revision of *Salvia*, subgenus *Calosphace*. *Repert Spec Nov Regni Veg* 110:1–381.
- Fan HY, Fu FH, Xu H, Zhang AH, Liu R. 2010. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A. *Thromb Res* 126:17–22.
- Gallegos RS, Roque NF. 1990. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C . *Quim Nova* 13:278–281.
- Guerra PM, Nodari OR. 2010. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovici PR, editors. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis. pp. 13–25.
- Harley RM, Atkins S, Budantsev AL, Cantino PD, Conn BJ, Grayer R, Harley MM, Rok R, Krestovskaya T, Morales R, Paton AJ, Ryding O, Upson T. 2004. *Labiatae*. In: Kadereit JW, Kubitzki K, editors. *The families and genera of vascular plants*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 167–236.
- Harley R, França F, Santos EP, Santos JS. 2010. *Lamiaceae*. In: *Lista de espécies da Flora Brasileira*. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012>.
- Hosseinzadeh H, Haddakhodaparast MH, Arash AR. 2003. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Salvia leriifolia* Benth. seed extract in mice and rats. *Phytother Res* 17:422–425.
- Janicsák G, Veres K, Kakasy AZ, Máthé I. 2006. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochem Syst Ecol* 34:392–396.
- Jimena ES, França F, Sobral M. 2009. *Lamiaceae*. In: Stehmann JR, Forzza RC, Salino S, Sobral M, Costa DP, Kaino LHY, editors. *Plantas da Floresta Atlântica*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. pp. 297–303.
- Kamatou GP, Viljoen AM, Gono-Bwalya AB, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, Lourens AC, Baser KH, Demirci B, Lindsey KL, Van Staden J, Steenkamp P. 2005. The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *J Ethnopharmacol* 102:382–390.
- Kassuya CAL, Wisniewski-Júnior A, Simionatto EL, Santos EP, Stefanello MEA. 2009. Composição dos óleos essenciais de *Salvia lachnostachys* e *Salvia melissiflora* (Lamiaceae). *Lat Am J Pharm* 28:919–921.
- Kontogianni VG, Exarchou V, Trognan A, Gerothanassis IP. 2009. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy—Comparison with HPLC methods. *Anal Chim Acta* 635:188–195.
- Mayer B, Baggio CH, Freitas CS, Santos C, Twardowsky A, Horst H, Pizzolatti MG, Micke GH, Heller M, Santos EP, Otuki MK, Marques MCA. 2009. Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. *Fitoterapia* 80:421–426.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons: Systematic anatomy of the leaf and stem*. Oxford: Clarendon. pp. 1041–1053.
- Novoa MC, Monti C, Vizcaino CE. 2005. Anatomía y etnobotánica de cuatro especies de Labiatae de la Provincia Biogeográfica Pampeana, usadas en la medicina popular. *Act Farm Bonaer* 24:512–520.
- Pollier J, Goossens A. 2012. Oleanolic acid. *Phytochemistry* 77:10–15.
- Richardson PM. 1992. The chemistry of the Labiatae: an introduction and overview. In: Harley RM, Reynolds T, editors. *Advances in labiatae science*. Kew: Royal Botanical Gardens. pp. 291–297.
- Rodríguez-Hahn L, Esquivel B, Sánchez C, Estebanes L, Cárdenas J, Soriano-García M, Toscano R, Ramamoorthy TP. 1989. Abietane type diterpenoids from *Salvia fruticulosa*. A revision of the structure of fruticuline B. *Phytochemistry* 28:567–570.
- Rodríguez-Hahn L, Esquivel B, Cárdenas J, Ramamoorthy TP. 1992. The distribution of diterpenoids in *Salvia*. In: Harley RM, Reynolds T, editors. *Advances in Labiatae science*. Kew: Royal Botanical Gardens. pp. 335–347.
- Santos EP. 2004. Notes on *Salvia* section *Nobiles* (Lamiaceae) and two new species from Brazil. *Kew Bull* 59:103–109.
- Schito AM, Piatti G, Stauder M, Bisio A, Giacomelli E, Romussi G, Pruzzo C. 2011. Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugata* Vahl. on biofilm production *in vitro* by multi-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Agents* 37:129–134.
- Seebacher W, Simic N, Weis R, Sat R, Kunert O. 2003. Complete assignments of 1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18a-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn Reson Chem* 41:636–638.
- Singh V, Sharma M, Jain DK. 1974. Trichomes in *Salvia* (Labiatae) and their taxonomic significance. *Bull Bot Surv India* 16:27–34.
- Sonboli A, Babakhani AM, Mehrabian AR. 2006. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Z Naturforsch* 61:160–164.
- Stearn WT. 1983. *Botanical Latin*. Great Britain: Redwood Press. p. 566.
- Topçú G. 2006. Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J Nat Prod* 69:482–487.
- Werker E. 1993. Function of essential oil secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae: A review. *Flavour Frag J* 8:249–255.
- Wood JRI, Harley RM. 1989. The genus *Salvia* (Labiatae) in Colombia. *Kew Bull* 44:211–278.